

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-026725

(43)Date of publication of application : 29.01.2003

(51)Int.Cl.

C08F 8/30

C07H 13/04

C07K 19/00

C12N 11/08

(21)Application number : 2001-213760

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 13.07.2001

(72)Inventor : NISHIGUCHI SUSUMU

SHIBATANI SHIGEO

TODA ATSUSHI

NISHIMURA SHINICHIRO

KUROKOCHI MASAKI

YAMADA KURIKO

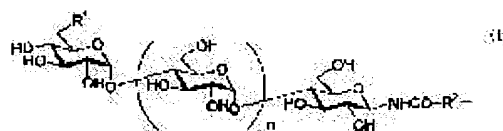
YUAN CHUAN LEE

(54) NOVEL MALTOSE-BONDED PROTEIN LIGAND AND ITS APPLICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for easily and efficiently purifying a chimeric protein of a maltose-bonded protein and an enzyme and to provide a method for immobilizing the chimeric protein whereby the enzyme is difficultly released from the carrier.

SOLUTION: A maltose-bonded protein ligand prepared by bonding a group represented by formula (I) (wherein R¹ is OH or NR³R⁴; R² is a linker having a length equivalent to that of a chain of 1-20 methylene groups; R³ and R⁴ are each independently of each other are each H or a 1-4C alkyl; and n is an integer of 0-5) to a polymeric carrier.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the macromolecule which has the structure of a new maltooligosaccharide derivative and this maltooligosaccharide derivative as a substructure. Moreover, this invention relates to the immobilized enzyme using the macromolecule which has this maltooligosaccharide derivative structure as a substructure.

[0002]

[Description of the Prior Art] Gene modification technology progresses in recent years, and various enzymes came to be produced by bacteria including *Escherichia coli*. However, when you try to make it discover the enzyme of the higher animal origins, such as *Homo sapiens*, manifestation protein forms the insoluble inclusions body, enzyme activity cannot often be discovered, and the approach of making the target enzyme discover as an effective solution means when such as a fusion protein with other protein (for it to be hereafter indicated as MBP), for example, maltose binding protein, a glutathione-S-transferase, etc. is used. For example, the approach of making it discover as a fusion protein with MBP is indicated by the patent No. 2703770 official report. In it, it can be discovered as fusibility protein, and also there is an advantage that a fusion protein can be refined, using the maltose affinity of MBP. The affinity chromatography which makes a bridge formation amylose support is used for purification, and the support is marketed by the trade name of amylose resin. However, it is not necessarily strong, when adsorption is weak in an enzyme not adsorbing depending on the case and it is washing before elution, an enzyme is eluted, and association of a bridge formation amylose and MBP may fully be unable to be refined. This originates in the substrate specificity of MBP and can be conquered by using support with more high compatibility.

[0003] Moreover, the enzyme which stuck to the bridge formation amylose can be used also as immobilized enzyme, and when compatibility with support is not enough, an enzyme cannot be combined, or the once fixed enzyme is desorbed from it. Support with high nearby compatibility is desired from the point referred to as preparing immobilized enzyme.

[0004] Although there are some which combined the maltooligosaccharide with agarose etc., using epichlorohydrin as a macromolecule which has a maltooligosaccharide chain in a side chain, since the consistency of a maltooligosaccharide chain is uncontrollable, an oligosaccharide chain cannot say that it is used not necessarily effective in association with MBP and the fusion protein of an enzyme. A maltooligosaccharide and the compound which has an amino group and a polymerization nature vinyl group in intramolecular are combined according to reduction amination, and there is a method of obtaining the macromolecule which has a maltooligosaccharide chain in a side chain in others by carrying out the polymerization of the polymerization nature vinyl group. However, by this approach, in order that the sugar in the reducing terminal of an oligosaccharide chain may carry out ring breakage, there is a fault that one sugar residue of a precious sugar chain will decrease. Moreover, in reduction amination, in order to use poisonous matter like a cyano sodium borohydride, there is also a fault of being dangerous.

[0005] In JP,2001-40046,A, it can prepare simple and the macromolecule with which the maltooligosaccharide was made to support as support with compatibility higher than a bridge formation amylose is indicated. However, maltooligosaccharide residue is bearing the compatibility with MBP and there is room to raise compatibility still more by carrying out chemical modification of the maltooligosaccharide residue part.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The object of this invention is using macromolecule support with compatibility higher than MBP to offer the approach and the fixed approach that it is efficient easily and moreover enzyme desorption cannot take place easily of it being efficient easily and carrying out separation purification of the fusion protein of MBP and an enzyme.

[0007]

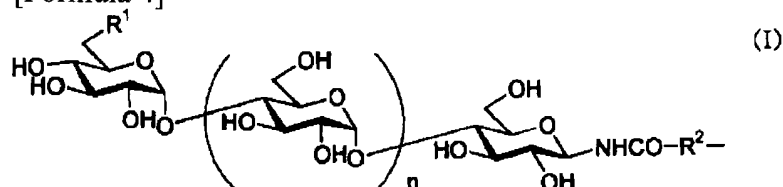
[Means for Solving the Problem] this invention persons came to complete a header and this invention for the above-mentioned trouble being solvable by compounding a new maltooligosaccharide derivative and obtaining the macromolecule with which this maltooligosaccharide derivative was supported, as a result of inquiring wholeheartedly, in order to solve the above-mentioned problem.

[0008] That is, this invention consists of the following configurations.

(1) It is the maltose binding protein ligand characterized by the radical expressed with a general formula (I) and (the linker in which, as for R¹, OH or NR three R⁴, and R² have the die length for 1-20 methylene groups, and R³ and R⁴ showing the alkyl group of H or carbon numbers 1-4 independently among a formula, and n showing the integer to 0-5) having joined together.

[0009]

[Formula 4]



[0010] (2) It is the maltose binding protein ligand of (1) whose R² is the radical expressed with the formula (II) and (R⁵ having shown the alkylene group of carbon numbers 1-19 among the formula, and R⁶ having shown O, S, or NH, and having combined with macromolecule support through R⁶).

[0011]

[Formula 5]

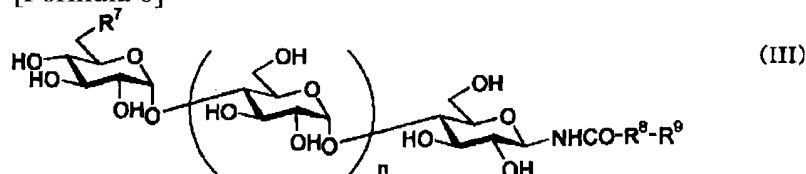


[0012] (3) (1) or (2) maltose binding protein ligands which are the polymer, copolymer, or polysaccharide of a vinyl compound chosen from the group which macromolecule support becomes from acrylamides, methacrylamide, acrylic acids, methacrylic acids, styrene, and fatty-acid vinyl ester.

(4) a general formula (III) (the linker in which, as for R⁷, OH or NR ten R¹¹, and R⁸ have the die length for 1-19 methylene groups among a formula --) As for NH₂, SH, OCOCH=CH₂, OCOC(CH₃)=CH₂, NHCOCH=CH₂ or NHCOC(CH₃)=CH₂, and R¹⁰ and R¹¹, R⁹ shows the alkyl group of H or carbon numbers 1-4 independently. n -- the integer to 0-5 -- being shown -- the maltooligosaccharide derivative characterized by what is expressed.

[0013]

[Formula 6]



[0014] (5) The maltooligosaccharide derivative of (4) whose R8 is the alkylene group of carbon numbers 1-19.

(6) Maltose binding protein ligand which consists of a copolymer characterized by including the maltooligosaccharide derivative of (4) or (5) and at least one kind of vinyl system monomer except that whose R9 is NH₂ or SH.

(7) Maltose binding protein ligand of (6) chosen from the group which a vinyl system monomer becomes from acrylamides, methacrylamide, acrylic acids, methacrylic acids, styrene, and fatty-acid vinyl ester.

(8) (6) or (7) maltose binding protein ligands which become at least one kind of intramolecular from the copolymer containing the vinyl system monomer which has two or more polymerization nature vinyl groups as a cross linking agent.

(9) Maltose binding protein ligand of (8) chosen from the group which a cross linking agent becomes from N and N'-methylenebis acrylamide, methacrylic-acid vinyl, methacrylic acid ethylene glycol, and a divinylbenzene.

(10) One maltose binding protein ligand of (6) - (9) which consists of a maltooligosaccharide derivative of (4) or (5) except that whose R9 is NH₂ or SH, and a copolymer whose copolymerization ratios of at least one kind of vinyl system monomer are 1:10-100000.

(11) One maltose binding protein ligand of (8) - (10) which the rate of a cross linking agent becomes from the copolymer which is 0.1 - 20%.

(12) -- the immobilized enzyme characterized by combining the fusion protein of maltose binding protein and an enzyme with one maltose binding protein ligand of (1) - (3) or (6) - (11).

(13) Immobilized enzyme of (12) whose an enzyme is a glycosyltransferase.

(14) Immobilized enzyme of (13) whose glycosyltransferases are beta 1 and 4-galactose transferring enzyme.

[0015]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the gestalt of operation of this invention is mentioned and it explains to a detail. The radical expressed with the above-mentioned general formula (I) on macromolecule support has combined the maltose binding protein ligand of this invention. The linker in which, as for R1, OH or NR three R4, and R2 have the die length for 1-20 methylene groups, and R3 and R4 show the alkyl group of H or carbon numbers 1-4 independently among a formula, and n shows the integer to 0-5. As a linker which has the die length for 1-20 methylene groups of R2 for example, the radical (the inside of a formula, and R5 -- the alkylene group of carbon numbers 1-19 --) expressed with the above-mentioned formula (II) It is illustrated. R6 -- O, S, or NH -- being shown -- as an alkylene group of the carbon numbers 1-19 of R5 A methylene group, ethylene, a propylene radical, a butylene radical, a hexylene radical, an octylene radical, a dodecylene radical, an OKUTA dodecylene radical, etc. are mentioned for a methyl group, an ethyl group, a propyl group, an isopropyl group, butyl, etc. as an alkyl group of the carbon numbers 1-4 of R3 and R4.

[0016] As maltose binding protein ligand of this invention, R1, R2, and n are combinable with arbitration.

[0017] If the macromolecule support which can be used by this invention can combine the radical expressed with a general formula (I), a polymer, a copolymer, or a polysaccharide of a vinyl compound chosen from the group which especially a limit does not have, for example, consists of acrylamides, methacrylamide, acrylic acids, methacrylic acids, styrene, and fatty-acid vinyl ester will be mentioned. As acrylamides, N-alkyl acrylamides, such as acrylamide, N-methylacrylamide, N-ethyl acrylamide, and N-isopropyl acrylamide, are illustrated. As methacrylamide, N-alkyl methacrylamide, such as methacrylamide, N-methyl methacrylamide, and N-isopropyl methacrylamide, is illustrated. As acrylic ester, a methyl acrylate, an ethyl acrylate, acrylic-acid hydroxyethyl, acrylic-acid dimethylaminoethyl, etc. are illustrated. As methacrylic ester, a methyl methacrylate, ethyl methacrylate, methacrylic-acid hydroxyethyl, dimethylaminoethyl methacrylate, etc. are illustrated. . Styrene, p-hydroxystyrene, etc. are illustrated as styrene. Vinyl acetate, butanoic acid vinyl, etc. are illustrated as fatty-acid vinyl ester. As a polysaccharide, polysaccharides over which the bridge was constructed, such as a cellulose, a chitin,

chitosan, and bridge formation agarose, a bridge formation dextran, are illustrated. Moreover, in order for the macromolecule support mentioned here to combine the maltooligosaccharide derivative expressed with a general formula (III), what was activated by the suitable approach is contained. Furthermore, all or the thing hydrolyzed in part is also contained in the polymer or copolymer of fatty-acid vinyl ester in this invention in an ester bond with the alkali after a polymerization reaction etc.

[0018] The maltose binding protein ligand which the radical expressed with a general formula (I) on the macromolecule support of this invention has combined can be obtained carrying out the graft copolymerization of the maltooligosaccharide derivative expressed with the general formula (III) except that whose R9 is NH₂ or SH, and the vinyl system monomer on copolymerization or macromolecule support, or by combining with the suitable functional group on the above-mentioned macromolecule support the maltooligosaccharide derivative expressed with the general formula (III) whose R9 is NH₂ or SH. Copolymerization can be performed by using technique, such as a radical polymerization, cationic polymerization, and anionic polymerization, and the radical polymerization which usually makes a ammonium peroxydisulfate etc. a catalyst can perform it. When carrying out copolymerization, a cross linking agent may be made to live together. If it is the vinyl system monomer which has two or more polymerization nature vinyl groups in intramolecular as a cross linking agent which can be used, there will be especially no limit and N and N'-methylenebis acrylamide, methacrylic-acid vinyl, methacrylic acid ethylene glycol, a divinylbenzene, etc. will be indicated. Moreover, as for the copolymerization ratio of the above-mentioned maltooligosaccharide derivative and a vinyl system monomer, 1:5-1 million are desirable, and especially 1:10-100000 are desirable. Furthermore, when [especially 0.1 - 20% of] using a cross linking agent, the rate of 0.05 - 30% is desirable to the total quantity of the above-mentioned maltooligosaccharide derivative and the above-mentioned vinyl system monomer, and it is desirable. Although there is especially no limit as an approach of combining with macromolecule support the maltooligosaccharide derivative expressed with the general formula (III) whose R9 is NH₂ or SH, it is desirable to activate the functional group on macromolecule support by the suitable approach. For example, it is desirable to be activated on N-hydroxysuccinic acid imide radical etc., when the functional group on giant-molecule support is a carboxyl group, and to activate 2-pyridyldisulfide group etc. in the case of a thiol group.

[0019] the various organic synthesis for which the maltooligosaccharide derivative expressed with the general formula (III) of this invention is usually used -- it is compoundable with chemical technique. For example, when R7 is OH and R9 is NH₂ or SH, a maltooligosaccharide is made to react with ammonium salt and it considers as glycosylamine, and after making it react to the bottom of the condensing agent existence represented by the carbodiimide with an N-protection-omega-amino fatty acid or an S-protection-omega-mercapto fatty acid, it can obtain by carrying out deprotection of N-protective group or the S-protective group. Moreover, when R7 is NH₂ and R9 are SH, it carries out till the place which carries out condensation to an S-protection-omega-mercapto fatty acid by the same approach as the above, the 4 or 6th place of the glucose residue of a nonreduction end is selectively benzylidene-ized using benzal bromide etc. after that, and the OH radical which remains further is acetylated using an acetic anhydride etc. After acetylating, the 6th place is azide-ized by cleaving selectively and subsequently processing the 6th place with a sodium azide by N-BUROMO succinimid etc. It can obtain by carrying out deprotection of the benzoyl of the 4th place at the same time it returns an azide radical to the amino group by catalytic reduction, and carrying out deprotection of deacetylation and the S-protective group using sodium methylate etc. further. Furthermore, when R7 is NH₂ and R9 are NHCOCH=CH₂, the 1st place is first benzyl-ized for a maltooligosaccharide with benzyl alcohol. Subsequently, after benzylidene-izing using benzal bromide etc. selectively [the nonreduction end glucose residue of a maltooligosaccharide] the 4 or 6th place, the 4th place of the deprotection of benzoyl is performed with the reduction to the amino group of azide-izing of the 6th place by the alternative cleavage of the 6th place by acetylation according the OH radical which remains similarly to an acetic anhydride etc., N-BUROMO succinimid, etc., and the sodium azide, deacetylation by sodium methylate, and the azide radical by catalytic reduction. Furthermore, the maltooligosaccharide permuted by the amino group of the glucose residue of a reducing terminal by which the 6th place of an OH

radical was protected is obtained by protecting the amino group by the suitable protective group. After making the obtained maltooligosaccharide into glycosylamine by the same approach as the above and carrying out condensation to an N-protection-omega-amino fatty acid, deprotection of the protective group of omega-amino group is carried out. Furthermore, after acryloyl-izing by chlorination acryloyl etc., the target maltooligosaccharide derivative can be obtained by carrying out deprotection of the protective group of the amino group which remains. Deprotection of the protective group of the amino group needs to be carried out on condition that [different] the protective group of an N-protection-omega-amino fatty acid, and nonreduction end glucose residue, respectively, and the 6th place of the combination of a t-butoxycarbonyl group etc. is mentioned, for example as a protective group of an N-protection-omega-amino fatty acid as the combination as a protective group of 6 place amino group of a benzyloxycarbonyl radical and nonreduction end glucose residue.

[0020] If the fusion protein of the maltose binding protein and the enzyme which can be used for the immobilized enzyme of this invention is a fusion protein of the maltose binding protein and the enzyme which have maltose affinity, there is especially no limit and, generally it can be obtained using the gene recombination technique. Moreover, as long as the enzyme has the target enzyme activity, it does not necessarily need to be the whole enzyme protein and may be the fragment. A glycosyltransferase is desirable although there is especially no limit as an enzyme which can be used. As a glycosyltransferase, galactose transferring enzyme, N-acetyl glucosamine transferring enzyme, fucose transferring enzyme, sialic-acid transferring enzyme, mannose transferring enzyme, N-acetyl galactosamine transferring enzyme, xylose transferring enzyme, glucuronic acid transferring enzyme, etc. are mentioned.

[0021] The immobilized enzyme of this invention can be prepared by contacting a copolymer and the above-mentioned fusion protein with the giant-molecule support, or the above-mentioned maltooligosaccharide derivative and the vinyl system monomer which the above-mentioned maltooligosaccharide derivative combined in a suitable solution. Although there will be especially no limit as a solution which can be used if the enzyme activity of a fusion protein does not deactivate, the buffer solution of the pH7 neighborhood is usually used. Metal salts, such as reducing agents, such as an additive which stabilizes a fusion protein, for example, 2-mercaptoethanol etc., calcium, magnesium, and manganese, may be added if needed. A copolymer or a graft copolymer, and a fusion protein are usually contacted at 0-40 degrees C in the above-mentioned buffer solution for 5 minutes to 24 hours. At this time, a shaking may be carried out quietly.

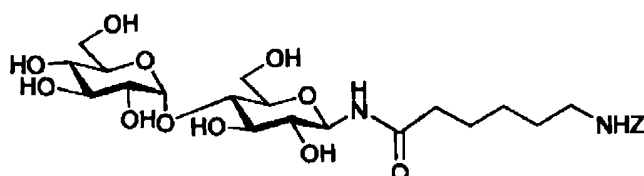
[0022]

[Example] This invention is not limited by this example although an example explains this invention further below at a detail.

[0023] Example 1 of reference Synthetic maltose 5g of a [6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil]-beta-malto sill amine and 39.8g of ammonium hydrogencarbonates were melted to 50ml of distilled water, and it stirred for five days at the room temperature. It condensed under reduced pressure of a reaction solution after the reaction, and azeotropy was repeated with toluene until the smell of an ammonium hydrogencarbonate disappeared. The residue and 6-N -(benzyloxycarbonyl)- 4g of amino hexanoic acids was melted to desiccation dimethylformamide 100ml, hydrochloric-acid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 4.0g and 3.2g of 1-hydroxy benzotriazol monohydrates were added, and it stirred at the room temperature for 24 hours. Chloroform washed the reaction solution after the reaction, and it extracted with water, and condensed under reduced pressure. It is Sephadex about this residue. It refined using LH-20 column chromatography (eluate 95% ethanol), and 3.5g of specified substance was obtained. A [6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil]-beta-malto sill amine has the following structure expression (Z shows a benzyloxycarbonyl radical among a formula).

[0024]

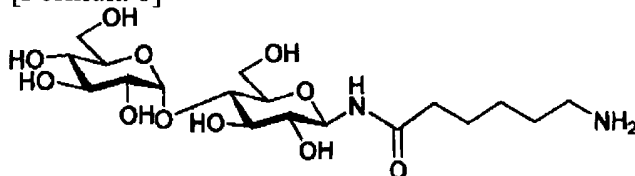
[Formula 7]



[0025] Example 1 [6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil]-beta-malto sill amine 100mg obtained in the example 1 of 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine reference was melted to methanol 30ml, 30mg of palladium carbon was added 10%, and it stirred at the room temperature under the hydrogen ambient atmosphere for 24 hours. After carrying out cerite filtration of the reaction solution, it condensed under reduced pressure of a filtrate and 72mg of specified substance was obtained. A 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine has the following structure expression.

[0026]

[Formula 8]

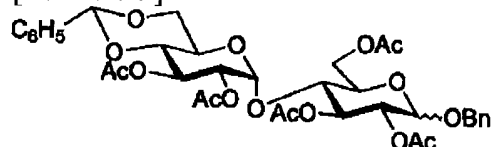


[0027] Example 2 of reference Synthetic maltose 17.1g and benzyl alcohol 54g of benzyl maltoside were taken, cation-exchange-resin Dowex50WX-8(Dow Chemical make)3g used as H⁺ mold at this was added, and it flowed back for 5 hours. After a reaction, Sephadex It refined using LH-20 (Amersham Pharmacia manufacture) column chromatography (eluate 95% ethanol), and 4.3g of specified substance was obtained.

[0028] Example 3 of reference Benzyls 2, 3, and 6, 2', and benzyl maltoside 4.3g obtained in the example 2 of synthetic reference of 3' - PENTA-O-acetyl-4', 6'-O-benzylidene-maltoside were melted to pyridine 50ml, benzal bromide 2.75g was added, and it stirred at 65 degrees C for 1 hour. After returning the reaction solution to a room temperature, 120ml of acetic anhydrides was added, and it stirred at the room temperature for 24 hours. A saturation sodium-hydrogencarbonate water solution and after chloroform extracted a reaction solution, and saturation brine's having washed subsequently, making it dry using anhydrous sodium sulfate and removing a sodium sulfate by cerite filtration, the filtrate was condensed under reduced pressure. The silica gel chromatography (eluate toluene: ethyl-acetate =2:1) refined the residue, and 2.5g of specified substance was obtained. Benzyls 2, 3, and 6, 2', and 3' - PENTA-O-acetyl-4', 6'-O-benzylidene-maltoside have the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula and Bn shows benzyl).

[0029]

[Formula 9]

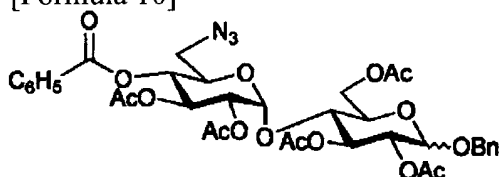


[0030] example 4 of reference benzyls 2, 3, and 6, 2', and 3' -- the - PENTA-O-acetyl -6 -- 'the - azide -4' -- the -O-benzoyl -6 -- 'benzyls 2, 3, 6, and 2 obtained in example 3 of synthetic reference of - deoxy-maltoside', and 3' - PENTA-O-acetyl-4', 6'-O-benzylidene-maltoside 1.5g it melts to the mixed solvent which consists of desiccation dichloroethane 50ml and 100ml of carbon tetrachlorides -- 1.1g of N-BUROMO succinimids, and 230mg of barium carbonates -- in addition, it stirred at 65 degrees C for 3 hours. Then, dimethylformamide 100ml and 2g of sodium azides were added to the reaction solution, and it stirred at 120 degrees C for 24 hours. After chloroform extracted the reaction solution, water washed and it condensed under reduced pressure. The silica gel chromatography (eluate toluene: ethyl-

acetate =2:1) refined the residue, and 400mg of specified substance was obtained. Benzyl 2, 3, and 6, 2', and 3' - PENTA-O-acetyl -6'-azide-4' -O-benzoyl -6'-deoxy-maltoside has the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula and Bn shows benzyl).

[0031]

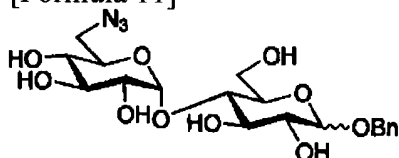
[Formula 10]



[0032] example 5 of reference the benzyl 6'-azide -6 -- 'the benzyls 2, 3, 6, and 2 obtained in the example 4 of synthetic reference of - deoxy-maltoside', and 3 -- 'the - PENTA-O-acetyl -6' - azide-4 '-O-benzoyl -6'-deoxy-maltoside 310mg was melted to desiccation methanol 50ml, 2.9ml of 1.66M sodium methylate-methanol solutions was added, and it agitated at the room temperature for 24 hours. After neutralizing to pH7 using cation-exchange-resin Dowex50WX-8 (Dow Chemical make) which used the reaction solution as H⁺ mold, resin was carried out the ** exception. Vacuum concentration of the filtrate was carried out and 174mg of specified substance was obtained. Benzyl 6' - azide -6'-deoxy-maltoside has the following structure expression (Bn shows benzyl among a formula).

[0033]

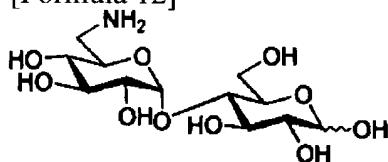
[Formula 11]



[0034] Example 6 of reference It obtained in the example 5 of 6'-amino-6'-deoxy-maltose reference. Benzyl 6'-azido-6'-deoxy-maltoside 137mg was melted to methanol 30ml, 30mg of palladium carbon was added 10%, and it agitated under the hydrogen ambient atmosphere for 24 hours. After carrying out cerite filtration of the reaction mixture, vacuum concentration of the filtrate was carried out and 97mg of specified substance was obtained. A 6'-amino-6'-deoxy-maltose has the following structure expression.

[0035]

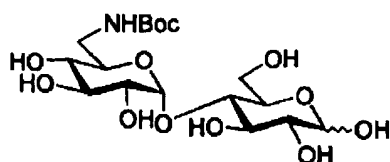
[Formula 12]



[0036] Example 7 of reference 6'-amino -6'-deoxy-maltose 68mg obtained in the example 6 of synthetic reference of a 6'-t-butoxycarbonylamino -6'-deoxy-maltose was melted in 10ml (2:1) of dioxane-water, and 0.2ml of 1-N sodium-hydroxide water solutions and 48mg of di-t-butyldicarbonate were added. Vacuum concentration was carried out after agitating at a room temperature for 1 hour. Sephadex It refined using G-10 (Amersham Pharmacia manufacture) column chromatography (eluate distilled water), and 79mg of specified substance was obtained. A 6'-t-butoxycarbonylamino -6'-deoxy-maltose has the following structure expression (Boc shows a t-butoxycarbonyl group among a formula).

[0037]

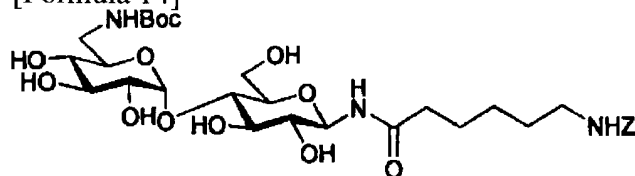
[Formula 13]



[0038] example 8 of reference the 6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil 6 -- 't-butoxycarbonylamino -6' -- 6 obtained in the example 7 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto sill amine -- 't-butoxycarbonylamino -6' - deoxy-maltose 66mg and 0.4g of sodium hydrogencarbonates were melted to 5ml of distilled water, and it stirred for five days at the room temperature. It condensed under reduced pressure of a reaction solution after the reaction, and azeotropy was repeated with toluene until the smell of an ammonium hydrogencarbonate disappeared. The residue and 6-N - (benzyloxycarbonyl)- 44mg of amino hexanoic acids was melted to desiccation dimethylformamide 5ml, hydrochloric-acid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 45mg and 36mg of 1-hydroxy benzotriazol monohydrates were added, and it stirred at the room temperature for 24 hours. Chloroform washed the reaction solution after the reaction, and it extracted with water, and condensed under reduced pressure. It is Sephadex about this residue. It refined using LH-20 column chromatography (eluate 95% ethanol), and 44mg of specified substance was obtained. A 6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil 6'-t-butoxycarbonylamino-6'-deoxy-beta-malto sill amine has the following structure expression (Boc shows a t-butoxycarbonyl group among a formula, and Z shows a benzyloxycarbonyl radical).

[0039]

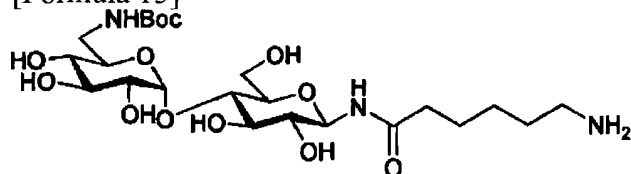
[Formula 14]



[0040] example 9 of reference 6-amino hexa noil 6 -- 't-butoxycarbonylamino -6' -- the 6-(N'-benzyloxycarbonyl)-amino hexa noil obtained in the example 8 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto sill amine -- 6 't-butoxycarbonylamino -6'-deoxy-beta-malto sill amine 35mg was melted to methanol 5ml, 15mg of palladium carbon was added 10%, and it stirred at the room temperature under the hydrogen ambient atmosphere for 24 hours. After carrying out cerite filtration of the reaction solution, it condensed under reduced pressure of a filtrate and 27mg of specified substance was obtained. A 6-amino hexa noil 6'-t-butoxycarbonylamino-6'-deoxy-beta-malto sill amine has the following structure expression (Boc shows a t-butoxycarbonyl group among a formula).

[0041]

[Formula 15]

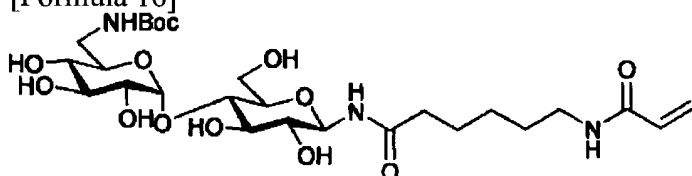


[0042] example 10 of reference 6-acryloylamino hexa noil 6 -- 't-butoxycarbonylamino -6' -- 6-amino hexa noil obtained in the example 9 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto sill amine -- 6 't-butoxycarbonylamino -6'-deoxy-beta-malto sill amine 27mg was dissolved in 5ml of distilled water, and 0.06ml of 1-N sodium-hydroxide water solutions was added. Furthermore, it was dropped, agitating tetrahydrofuran 0.5ml containing chlorination acryloyl 6mg under ice-cooling. At this time, 0.2-N sodium-hydroxide water solution was added suitably, and pH was adjusted so that pH8.5 might be maintained. After about 2-hour churning, with 1-N hydrochloric acid, reaction mixture was neutralized and it freeze-dried. Residue was dissolved by ethanol 70%, it refined using Sephadex LH-20 (Amersham

Pharmacia manufacture) column chromatography (eluate 70% ethanol), and 12mg of specified substance was obtained. A 6-acryloylamino hexa noil 6'-t-butoxycarbonylamino-6'-deoxy-beta-malto sill amine has the following structure expression (Boc shows a t-butoxycarbonyl group among a formula).

[0043]

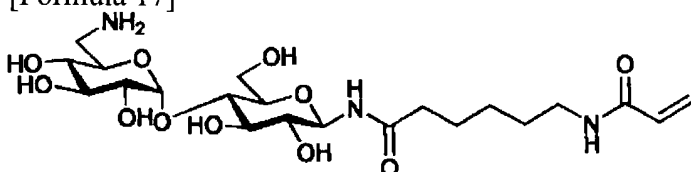
[Formula 16]



[0044] example 2 6-acryloylamino hexa noil 6 -- 'the - amino -6' -- 6-acryloylamino hexa noil obtained in the example 10 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto sill amine -- 6'-t-butoxycarbonylamino-6'-deoxy-beta-malto sill amine 12mg was taken, 5ml of triphloroacetic acid water solutions was added to this 30%, and it agitated for 30 minutes at the room temperature. Diethylether was added to reaction mixture after the reaction, and the product was settled. After diethylether washed precipitate several times, this was dried and 9mg of specified substance was obtained. A 6-acryloylamino hexa noil 6'-amino-6'-deoxy-beta-malto sill amine has the following structure expression.

[0045]

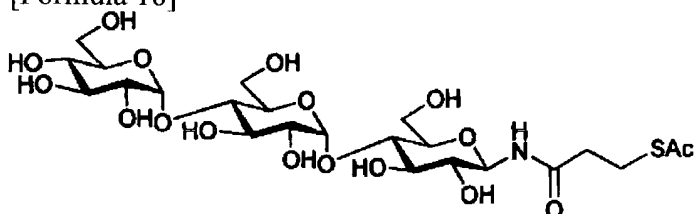
[Formula 17]



[0046] Example 11 of reference Synthetic maltotriose 15.5g of a 3-S-acetyl thio PUROI oil beta-malto trio sill amine and 94g of ammonium hydrogencarbonates were melted to 100ml of distilled water, and it stirred for five days at the room temperature. It condensed under reduced pressure of a reaction solution after the reaction, and azeotropy was repeated with toluene until the smell of an ammonium hydrogencarbonate disappeared. The residue and 5.3g of 3-S-acetyl mercaptopropionic acid were melted to desiccation dimethylformamide 100ml, hydrochloric-acid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 5.7g and 4.6g of 1-hydroxy benzotriazol monohydrates were added, and it stirred at the room temperature for 24 hours. Chloroform washed the reaction solution after the reaction, and it extracted with water, and condensed under reduced pressure. It is Sephadex about this residue. It refined using LH-20 column chromatography (eluate 95% ethanol), and 8.4g of specified substance was obtained. A 3-S-acetyl thio PUROI oil beta-malto trio sill amine has the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula).

[0047]

[Formula 18]

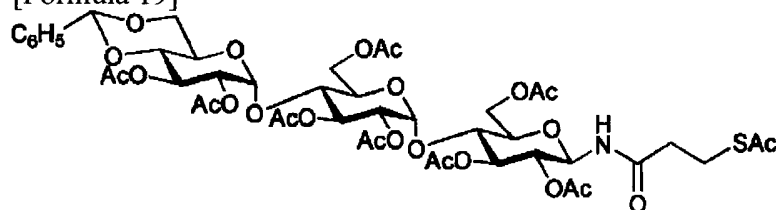


[0048] example 12 of reference three - S - acetyl -- thio -- PUROI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' - three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- three -- "the - OKUTA-O-acetyl -4" and 6 -- " -- 3-S-acetyl thio PUROI oil beta-malto trio sill amine 6.4g obtained in the example 11 of synthetic reference of a -O-benzylidene-beta-malto trio sill amine It melted to pyridine 100ml, benzal bromide 2.8g was added, and

it stirred at 65 degrees C for 1 hour. After returning the reaction solution to a room temperature, 150ml of acetic anhydrides was added, and it stirred at the room temperature for 24 hours. A saturation sodium-hydrogencarbonate water solution and after chloroform extracted a reaction solution, and saturation brine's having washed subsequently, making it dry using anhydrous sodium sulfate and removing a sodium sulfate by cerite filtration, the filtrate was condensed under reduced pressure. The silica gel chromatography (eluate toluene: ethyl-acetate =2:1) refined the residue, and 2.2g of specified substance was obtained. three - S - acetyl -- thio -- PUROPI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' -- three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- three -- " - OKUTA - O - acetyl - four -- " -- six -- " - O - benzylidene - beta - malto one -- a trio -- a sill -- an amine -- the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula) -- having .

[0049]

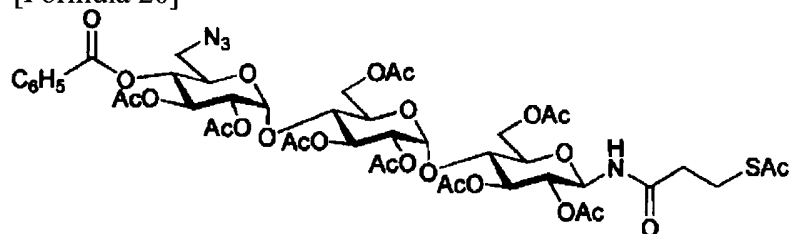
[Formula 19]



[0050] example 13 of reference three - S - acetyl -- thio -- PUROPI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' - - three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- three -- " - the OKUTA-O-acetyl-6 " - azide -4"-O-benzoyl -6 -- " -- the 3-S-acetyl thio PUROPI oil 2, 3, and 6 obtained in the example 12 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto trio sill amine -- two -- ' -- three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- three -- " - OKUTA-O-acetyl-4"6"-O-benzylidene-beta-malto trio sill amine 2.1g it melts to the mixed solvent which consists of desiccation dichloroethane 50ml and 100ml of carbon tetrachlorides -- 1.1g of N-BUROMO succinimids, and 230mg of barium carbonates -- in addition, it stirred at 65 degrees C for 3 hours. Then, dimethylformamide 100ml and 2g of sodium azides were added to the reaction solution, and it stirred at 120 degrees C for 24 hours. After chloroform extracted the reaction solution, water washed and it condensed under reduced pressure. The silica gel chromatography (eluate toluene: ethyl-acetate =2:1) refined the residue, and 589mg of specified substance was obtained. three - S - acetyl -- thio -- PUROPI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' -- three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- 3 " - OKUTA-O-acetyl -6" - azide - - a -4 " -O-benzoyl -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine has the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula).

[0051]

[Formula 20]

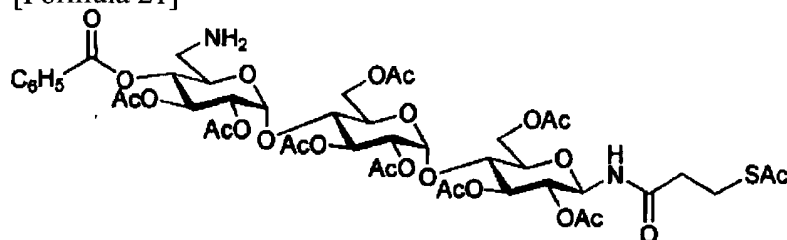


[0052] example 14 of reference three - S - acetyl -- thio -- PUROPI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' - - three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- three -- "the - OKUTA-O-acetyl-6 " - amino -4"-benzoyl -6" -- the 3-S-acetyl thio PUROPI oil 2, 3, 6, and 2 obtained in the example 13 of synthetic reference of a - deoxy-beta-malto trio sill amine -- ' -- 3', 6', and 2" -- the 3 " - OKUTA-O-acetyl -6"-azide -4 -- " -O-benzoyl -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine 550mg It melted to methanol 50ml, 30mg of palladium carbon was added 10%, and it agitated under the hydrogen ambient atmosphere for 24 hours. After carrying out cerite filtration of the reaction mixture, vacuum concentration of the filtrate was carried out and 510mg of specified substance was obtained. three - S - acetyl -- thio -- PUROPI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' -- three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- 3 " - OKUTA-O-acetyl -6" - amino -- a -4 " - benzoyl -6"-deoxy-

beta-malto trio sill amine has the following structure expression (Ac shows an acetyl group among a formula).

[0053]

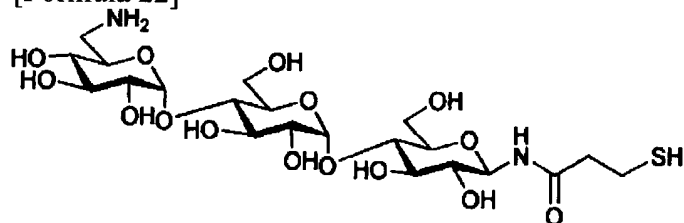
[Formula 21]



[0054] example 3 three - mercapto -- PUROI -- oil -- six -- " - amino - six -- " - deoxy one - beta - malto one -- a trio -- a sill -- an amine -- composition -- reference -- an example -- 14 -- having obtained -- three - S - acetyl -- thio -- PUROI -- oil -- two -- three -- six -- two -- ' -- three -- ' -- six -- ' -- two -- " -- the 3 " - OKUTA-O-acetyl -6"-amino -4 -- " - benzoyl -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine 107mg It melted to desiccation methanol 20ml, 1.1ml of 1.66M sodium methylate-methanol solutions was added, and it agitated at the room temperature for 24 hours. After neutralizing to pH7 using cation-exchange-resin Dowex50WX-8 (Dow Chemical make) which used the reaction solution as H⁺ mold, resin was carried out the ** exception. Vacuum concentration of the filtrate was carried out and 55mg of specified substance was obtained. A 3-mercaptopuROI oil 6 " - amino -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine has the following structure expression.

[0055]

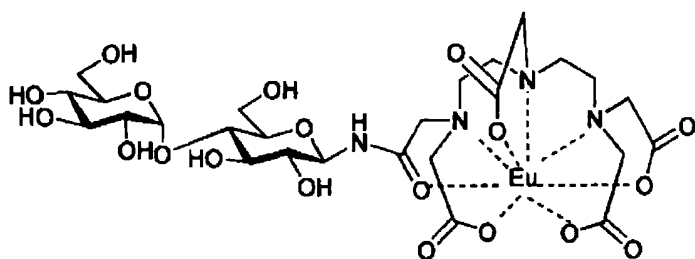
[Formula 22]



[0056] Example 15 of reference N, N', and synthetic maltose 50mg of an N"N"-tetrapod carboxymethyl diethylene TORIAMINOASECHIRU-beta-malto sill amine-europium complex and 10g of ammonium hydrogencarbonates were melted to 50ml of distilled water, and it stirred for five days at the room temperature. It condensed under reduced pressure of a reaction solution after the reaction, and azeotropy was repeated with toluene until the smell of an ammonium hydrogencarbonate disappeared. It is anhydrous diethylenetriamine to the residue. - N, N, N', and 149mg of N"N"-5 acetic acids were added, and it melted in 3ml of sodium-hydrogencarbonate water solutions 10%, and agitated at the room temperature for 2 hours. Sephadex It refined using G-10 (Amersham Pharmacia manufacture) column chromatography (eluate distilled water). The product fraction was freeze-dried, 10mg of obtained solids was dissolved in 2ml of distilled water, acetic-acid europium 9mg was added, and it agitated at the room temperature for 1 hour. It is Sephadex about reaction mixture. G-10 (Amersham Pharmacia manufacture) column chromatography (eluate distilled water) was performed twice, and was refined, and 45mg of specified substance was obtained. N, N', and an N"N"-tetrapod carboxymethyl diethylene TORIAMINOASECHIRU-beta-malto sill amine-europium complex have the following structure expression.

[0057]

[Formula 23]



[0058] Example 4 It is 0.1ml of 25mM phosphate buffer solution (it omits pH7.4, 0.9%NaCl content, and Following PBS) solutions of 200nM maltose binding protein to the assessment 96 hole microplate of the compatibility of the various maltooligosaccharide derivatives and maltose binding protein by DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro-immunoassay). In addition, after performing incubation at 4 degrees C for 24 hours and removing a maltose binding protein solution, 3 times, it washed by PBS(0.05%Tween20 content)0.2ml, and maltose binding protein was coated on the plate. Next, N and N' which were obtained in the maltooligosaccharide derivative and the example 15 of reference of various concentration, and the mixed solution 3microM Containing an N''N''-tetrapod carboxymethyl diethylene TORIAMINOASECHIRU-beta-malto sill amine-europium complex were prepared, and, in addition to [every / 1 / 50micro] the plate hole which coated maltose binding protein, it put for 30 minutes at the room temperature. then, after removing a mixed solution and washing by PBS(0.05%Tween20 content)0.2ml 8 times, 0.15ml (50micro M acid-ized trioctyl phone fin and 15microM -- 4, 4, 4-TORIFURORO-1-(2-naphthyl)-1, 3-butanedione, and the 0.1M acetic-acid-potassium-hydrogen-phthalate buffer solution (pH3.2) that contains a triton X-100 0.1%) of enhancement solutions was added, and they were vibrated for 15 minutes. And europium ion concentration which separated was measured with the fluorophotometer (excitation wavelength of 340nm, fluorescence wavelength of 615nm). The europium ion concentration which separated to maltooligosaccharide derivative concentration was plotted, and it asked for maltose binding protein, N, N', and the inhibition constant to association with an N''N''-tetrapod carboxymethyl diethylene TORIAMINOASECHIRU-beta-malto sill amine-europium complex. As a maltooligosaccharide derivative, the maltooligosaccharide derivative obtained in a maltose, a maltotriose, and the examples 1-3 was used. Compared with the maltooligosaccharide which corresponds respectively, compatibility [as opposed to maltose binding protein in the direction of a maltooligosaccharide derivative] was improving.

[0059]

[A table 1]

| | 阻害定数 (IC ₅₀) |
|----------|--------------------------|
| マルトース | 700 μM |
| マルトトリオース | 1.2 μM |
| 実施例 1 | 3 μM |
| 実施例 2 | 1.2 μM |
| 実施例 3 | 0.3 μM |

[0060] Example 5 NHS activation Sepharose which melted 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine 23mg obtained in the preparation example 1 of 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine joint sepharose to 5ml (pH7.0) of 50mMHEPES buffer solutions, and was beforehand washed with 1mM hydrochloric acid 4FF(Amersham Pharmacia manufacture)2ml was added, and it shook quietly at the room temperature for 4 hours. Resin was carried out the ** exception, 5ml (pH8.0) of 50 mMTris-HCl buffer solutions was added to this, and the active site which remains on resin was blocked by shaking quietly at

a room temperature for 4 hours. 50mM acetic-acid buffer solution (pH4.0) and 50 mMTris-HCl buffer solution (pH8.0) washed by a unit of 3 times by turns, and refrigeration preservation was carried out in 20 mMTris-HCl buffer solution (pH8.0).

[0061] example 6 6-acryloylamino hexa noil 6 -- 'the - amino -6' -- 6-acryloylamino hexa noil 6 obtained in the preparation example 2 of the copolymer (1:1000) of a - deoxy-beta-malto sill amine and acrylamide -- 'the - amino -6' - deoxy-beta-malto sill amine 5mg and acrylamide 710mg It dissolved in 25ml of distilled water, and N and N'-methylenebis acrylamide 57mg, N and N', and N'-tetramethylethylenediamine 10microl were added here, and it dissolved. A solution is cooled at 4 degrees C, 125micro of ammonium-peroxydisulfate water solutions I was added here 10%, and it was made to carry out a polymerization for 1 hour. The obtained gel was freeze-dried after the polymerization and 750mg of copolymers was obtained. After carrying out gay JIZAIZU of the copolymer, it carried out refrigeration preservation in 20 mMTris-HCl buffer solution (pH8.0).

[0062] example 7 3-mercapto PUROI oil 6 -- "the - amino -6" -- 3-mercapto PUROI oil 6 obtained in the preparation example 3 of - deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose -- "- amino -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine 29mg -- 5ml (pH7.0) of 50mMHEPES buffer solutions -- melting -- activation Thiol Sepharose 4FF(Amersham Pharmacia manufacture)2ml was added, and it shook quietly at the room temperature for 12 hours. Resin was carried out the ** exception, and after 25mMHEPES buffer solution (pH7.4) which contains cow serum albumin 0.1% washed enough, refrigeration preservation was carried out in 20 mMTris-HCl buffer solution (pH8.0).

[0063] Example 15 of reference 40micro of activity measurement method enzyme liquid I of suitable concentration of beta 1 and 4-galactose transferring enzyme In addition to a 19mMD(s)-glucose, a 0.37mMUDP-galactose, 0.14mM beta-NADH, 1.3mM phosphoenolpyruvic acid, a 17.5U pyruvate kinase, 25U lactate dehydrogenase, a 5.0mM manganese chloride water solution, and 3.025ml (pH8.4) of 52mM glycylglycine buffer solutions containing a 0.02%alpha-lactalbumin, the about 10 min reaction was carried out at 30 degrees C, and reduction of an absorbance (it is hereafter indicated as A340) which can be set 340nm was recorded. 20 mMTris-HCl buffer solution (pH7.5, 2mM ethylenediaminetetraacetic acid and 4Na, and 2mM 2-mercaptoethanol are contained) was used instead of enzyme liquid as a blank. It asked for a part for deltaA340/of maxes of a test and a blank, and activity was computed according to the following formulas.

$$U/ml = (\Delta A_{340} / (\text{test}) - \Delta A_{430} / (\text{blank})) \times 3.065 / 6.022 / 0.04$$
 [0064] In addition, the amount of enzymes which carries out galactose 1umol transition from UDP-galactose to D-glucose in 1 minute was defined as 1U by 30 degrees C and pH8.4 under alpha-lactalbumin existence.

[0065] Example 16 of reference From beta 1 and 4-galactose transferring enzyme gene which were acquired from the preparation Homo sapiens placenta of MBP-beta 1 and 4-galactose transferring enzyme fusion protein, the gene which removed the part which carries out the code of the film bonding site was inserted in EcoRI and the SalI site of vector pMAL-p2 (product made from NEB), and MBP-beta 1 and 4-galactose transferring enzyme fusion protein expression vector pMG-P21 were prepared. The transformation of Escherichia coli (Escherichia coli) JM 109 was carried out by this expression vector pMG-P21, and MBP-beta 1 and 4-galactose transferring enzyme fusion protein production bacillus Escherichia coli JM 109 (pMG-P21) were obtained. Inoculation of the bacteria was carried out to 500ml ***** of 50ml of LB culture media which contain glucose and ampicillin 50 mg/L 0.2% which entered, and shaking culture was carried out by 180rpm for 37 degrees C and 16 hours. 30ml inoculation of the obtained culture medium was carried out to 5L ** jar fermenter containing the above-mentioned culture-medium 3L, and it agitated and cultivated by 300rpm for a part for 25 degrees C and quantity-of-airflow 1.5L/, and 6 hours. Then, isopropyl-beta-D-thio galactopyranoside was added so that it might be set to 0.3mM(s), and culture was continued for further 18 hours. Centrifugal separation of the obtained culture medium was carried out, and biomasses were collected. The collected biomasses were suspended in 20 mMTris-HCl(it is indicated as column buffer (pH7.4, 0.1MNaCl) below pH7.4;) 150ml containing 0.1MNaCl(s), 1mM ethylenediaminetetraacetic acid and 2Na, and 10mM 2-mercaptoethanol, by the ultrasonic crusher, the biomass was crushed and the fusion protein was extracted.

[0066] Centrifugal separation of the crushing liquid was carried out, and 155ml of cell-free extracts was obtained. beta 1 of a cell-free extract and 4-galactose transferring enzyme activity were 1.4U/ml, and specific activity was 80 mU(s)/mg-protein. Polyethyleneimine was gradually added to the obtained cell-free extract, agitating until it became at 0.7%. pH was adjusted by HCl so that pH might not exceed 8 at this time. Churning was continued for 30 more minutes after addition. The produced precipitate was removed by centrifugal separation and 160ml of supernatant liquid was obtained. It added here gradually, agitating an ammonium sulfate at 75.5g (70% saturation) 4 degrees C. Churning was continued after addition for further 1 hour. The produced precipitate was collected in centrifugal separation. The obtained precipitate was remelted by the column buffer (pH8.0), and was set to 30ml. This was desalted by dialysis (outside liquid is a column buffer (pH8.0)). DEAE-Sepharose which equilibrated by the column buffer (pH8.0) beforehand It refined as MBP-beta 1 and 18ml of 4-galactose transferring enzyme fusion protein fractions by making the desalted enzyme liquid stick to the column filled up with 50ml CL6B (Amersham Pharmacia manufacture), and making it eluted after washing in this buffer 150ml by the linear gradient using this buffer 250ml and column buffer (pH8.0, 0.1MNaCl) 250ml. The obtained purification enzyme liquid was activity 6.2U/ml and specific activity 3.2U/mg-protein.

[0067] Example 17 of reference Immobilization beta 1, the activity measurement method immobilization 1 of 4-galactose transferring enzyme, and 4-galactose transferring enzyme A suitable amount and **, 100nM(s) PA-ized oligosaccharide (GlcNAcbeta1 ->2Manalpha1 ->3(GlcNAcbeta1 ->2Manalpha1 ->6) Manbeta1 ->4GlcNAcbeta1 ->4 GlcNAc-PA), While carrying out shaking churning at 20 degrees C for 1 hour among 100micro (pH7.5) of 25mMHEPES buffer solutions 1 containing 200microMUDP-Gal, 10mM manganese chloride, and alpha-lactalbumin 0.26mg/ml It was made to react. The quantum of the amount of products was carried out by HPLC after the reaction. Using the enzyme liquid which measured activity beforehand by the activity measurement method of the example 15 of reference, the above-mentioned activity measurement reaction was performed, the amount of galactose transition was calculated from the amount of products, the calibration curve was created, and activity was computed from the calibration curve.

[0068] Example 8 Immobilization of beta 1 and 4-galactose transferring enzyme (the 1)
6-amino hexa noil-beta-malto sill amine joint sepharose 50microl obtained in the example 5 was taken, purification enzyme liquid 50microl obtained in the example 16 of reference to this and column buffer (pH8.0) 200microl were added, and it shook quietly at 4 degrees C for 2 hours. Immobilization beta 1 and 4-galactose transferring enzyme were obtained by removing supernatant liquid according to centrifugal separation, and washing twice by column buffer (pH8.0) 200microl. The penetrant remover was united with supernatant liquid and it considered as recovery liquid. The enzyme activity of recovery liquid and immobilization beta 1, and 4-galactose transferring enzyme was measured, and activity recovery was computed. The activity of immobilized enzyme was 420 mU(s)/ml-resin, and activity recovery was 22%.

[0069] Example 9 Immobilization of beta 1 and 4-galactose transferring enzyme (the 2)
6-acryloylamino obtained in the example 6 instead of the 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine joint sepharose obtained in the example 5 -- immobilization beta 1 and 4-galactose transferring enzyme were prepared like the example 8 except using the copolymer of a hexa noil 6 '- amino -6'-deoxy-beta-malto sill amine and acrylamide. The activity of the obtained immobilized enzyme was 330 mU(s)/ml-resin, and activity recovery was 23%.

[0070] Example 10 Immobilization of beta 1 and 4-galactose transferring enzyme (the 3)
3-mercapto PUROI oil 6 obtained in the example 7 instead of the 6-amino hexa noil-beta-malto sill amine joint sepharose obtained in the example 5 -- immobilization beta 1 and 4-galactose transferring enzyme were prepared like the example 8 except using "- amino -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose. The activity of the obtained immobilized enzyme was 470 mU(s)/ml-resin, and activity recovery was 21%.

[0071] Example 11 Immobilization of beta 1 and 4-galactose transferring enzyme (the 4)
Immobilization beta 1 and 4-galactose transferring enzyme were prepared like the example 10 except

using 250micro of cell-free extracts l obtained in the example 16 of reference instead of purification enzyme liquid 50microl obtained in the example 16 of reference, and column buffer (pH8.0) 200microl. The activity of the obtained immobilized enzyme was 400 mU(s)/ml-resin, and activity recovery was 20%.

[0072] example 1 of a comparison 3-mercapto PUROI oil 6 obtained in beta 1 to amylose resin (product made from NEB), and the fixed example 7 of 4-galactose transferring enzyme -- immobilization beta 1 and 4-galactose transferring enzyme were prepared like the example 9 except using amylose resin instead of "- amino -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose. However, the activity as immobilized enzyme was not accepted. All activity is collected as recovery liquid and the enzyme was not combined with amylose resin.

[0073] example 12 3-mercapto PUROI oil 6 -- "the - amino-6 "3obtained in MBP-beta [using - deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose] 1, and purification example 7 of 4-galactose transferring enzyme fusion protein-mercapto PUROI oil 6"-amino -6" -- the column was filled up with - deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose 1ml, 0.5ml of cell-free extracts obtained in the example 16 of reference was dipped, and the fusion protein was made to adsorb The column was washed by after [adsorption] column buffer (pH7.4, 0.1MNaCl) 5ml. The fusion protein was made eluted after washing in column buffer (pH7.4, 0.1MNaCl) 3ml containing 10mM maltose, and beta 1 and 4-galactose transferring enzyme activity fractions were collected. The specific activity of the obtained enzyme liquid is 1.1U/mg-protein, and was improving about 13 times.

[0074] example 2 of a comparison 3-mercapto PUROI oil 6 obtained in MBP-beta 1 using amylose resin (product made from NEB), and the purification example 7 of 4-galactose transferring enzyme fusion protein -- use amylose resin (product made from NEB) instead of "- amino -6"-deoxy-beta-malto trio sill amine joint sepharose, and make a fusion protein adsorb like an example 12 -- obtaining Although carried out, it did not adsorb, but activity was collected in the penetrant remover, and the fusion protein was not able to be refined.

[0075]

[Effect of the Invention] As mentioned above, by using the maltose binding protein ligand which combined the maltooligosaccharide derivative on the macromolecule support of this invention, the enzyme made to discover as a fusion protein with maltose binding protein can be refined efficiently and easily, or it can fix.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

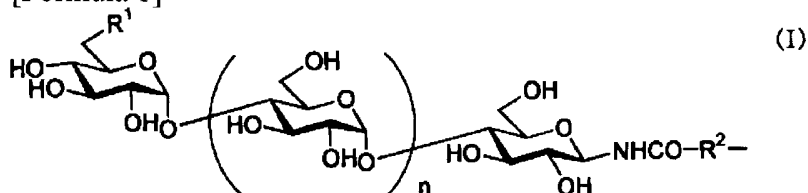
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] It is a general formula (I) on macromolecule support.

[Formula 1]



It is the maltose binding protein ligand characterized by the radical expressed with (the linker in which, as for R1, OH or NR three R4, and R2 have the die length for 1-20 methylene groups, and R3 and R4 show the alkyl group of H or carbon numbers 1-4 independently among a formula, and n shows the integer to 0-5) having joined together.

[Claim 2] R2 is a formula (II).

[Formula 2]

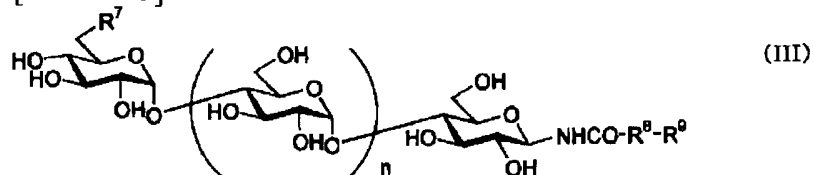


It is the maltose binding protein ligand according to claim 1 which is the radical expressed with (R5 having shown the alkylene group of carbon numbers 1-19 among the formula, and R6 having shown O, S, or NH, and having combined with macromolecule support through R6).

[Claim 3] Maltose binding protein ligand according to claim 1 or 2 which is the polymer, copolymer, or polysaccharide of a vinyl compound chosen from the group which macromolecule support becomes from acrylamides, methacrylamide, acrylic acids, methacrylic acids, styrene, and fatty-acid vinyl ester.

[Claim 4] General formula (III)

[Formula 3]



the linker in which, as for R7, OH or NR ten R11, and R8 have the die length for 1-19 methylene groups among a formula -- As for NH2, SH, OCOCH=CH2, OCOC(CH3)=CH2, NHCOCH=CH2 or NHCOC(CH3)=CH2, and R10 and R11, R9 shows the alkyl group of H or carbon numbers 1-4 independently. n -- the integer to 0-5 -- being shown -- the maltooligosaccharide derivative characterized by what is expressed.

[Claim 5] The maltooligosaccharide derivative according to claim 4 whose R8 is the alkylene group of carbon numbers 1-19.

[Claim 6] Maltose binding protein ligand set to claim 4 except that whose R9 is NH₂ or SH, or 5 from the copolymer characterized by including the maltooligosaccharide derivative of a publication, and at least one kind of vinyl system monomer.

[Claim 7] Maltose binding protein ligand according to claim 6 chosen from the group which a vinyl system monomer becomes from acrylamides, methacrylamide, acrylic acids, methacrylic acids, styrene, and fatty-acid vinyl ester.

[Claim 8] Maltose binding protein ligand according to claim 6 or 7 which becomes at least one kind of intramolecular from the copolymer containing the vinyl system monomer which has two or more polymerization nature vinyl groups as a cross linking agent.

[Claim 9] Maltose binding protein ligand according to claim 8 chosen from the group which a cross linking agent becomes from N and N'-methylenebis acrylamide, methacrylic-acid vinyl, methacrylic acid ethylene glycol, and a divinylbenzene.

[Claim 10] Maltose binding protein ligand according to claim 6 to 9 set to claim 4 except that whose R9 is NH₂ or SH, or 5 from the maltooligosaccharide derivative of a publication, and the copolymer whose copolymerization ratios of at least one kind of vinyl system monomer are 1:10-100000.

[Claim 11] Maltose binding protein ligand according to claim 8 to 10 which the rate of a cross linking agent becomes from the copolymer which is 0.1 - 20%.

[Claim 12] Immobilized enzyme characterized by combining the fusion protein of maltose binding protein and an enzyme with claims 1-3 or maltose binding protein ligand given in either 6-11.

[Claim 13] Immobilized enzyme according to claim 12 whose enzyme is a glycosyltransferase.

[Claim 14] Immobilized enzyme according to claim 13 whose glycosyltransferases are beta 1 and 4-galactose transferring enzyme.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-26725

(P2003-26725A)

(43)公開日 平成15年1月29日(2003.1.29)

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード*(参考) |
|--------------------------|------|---------------|------------|
| C 0 8 F 8/30 | | C 0 8 F 8/30 | 4 B 0 3 3 |
| C 0 7 H 13/04 | | C 0 7 H 13/04 | 4 C 0 5 7 |
| C 0 7 K 19/00 | | C 0 7 K 19/00 | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 N 11/08 | | C 1 2 N 11/08 | 4 J 1 0 0 |

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 14 頁)

(21)出願番号 特願2001-213760(P2001-213760)

(22)出願日 平成13年7月13日(2001.7.13)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「グリコクラスター制御生体分子合成技術」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 西口 進

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡

績株式会社総合研究所内

(72)発明者 柴谷 滋郎

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡

績株式会社総合研究所内

(72)発明者 戸田 篤志

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なマルトース結合蛋白質リガンドとその利用

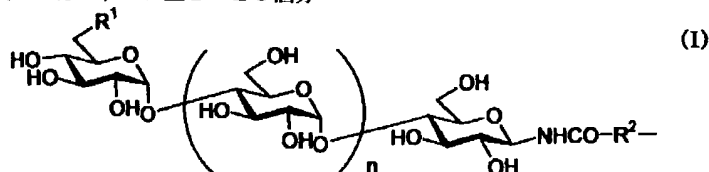
(57)【要約】

【課題】マルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質の容易で、効率よい精製方法および酵素脱離の起こりにくい該融合蛋白質の固定化方法を提供する。

【解決手段】高分子担体上に一般式(Ⅰ)(式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1~20個分

の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1~4のアルキル基を示し、nは0~5までの整数を示す)で表される基が結合したマルトース結合蛋白質リガンド。

【化1】

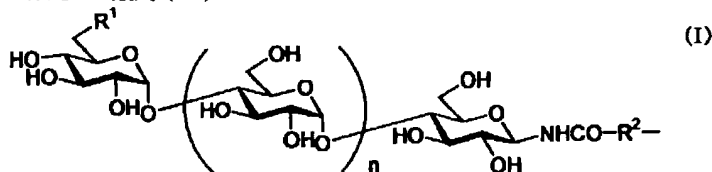


【特許請求の範囲】

【請求項1】 高分子担体上に一般式 (I)

* 【化1】

*



(式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1～20個分の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1～4のアルキル基を示し、nは0～5までの整数を示す)で表される基が結合していることを特徴とするマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項2】 R²が式 (II)

【化2】



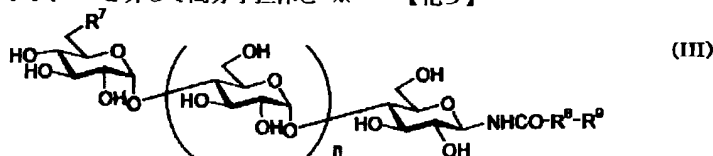
(式中、R⁵は炭素数1～19のアルキレン基、R⁶はO、SあるいはNHを示し、R⁶を介して高分子担体と

※結合している)で表される基である請求項1に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項3】 高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖である請求項1または2に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項4】 一般式 (III)

【化3】



(式中、R⁷はOHまたはNR¹⁰R¹¹、R⁸はメチレン基1～19個分の長さを有するリンカー、R⁹はNH₂、SH、OCOCH=CH₂、OCOC(CH₃)=CH₂、NHCOCH=CH₂またはNHCOC(CH₃)=CH₂、R¹⁰およびR¹¹は独立してHまたは炭素数1～4のアルキル基を示し、nは0～5までの整数を示す)で表されることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体。

【請求項5】 R⁸が炭素数1～19のアルキレン基である請求項4に記載のマルトオリゴ糖誘導体。

【請求項6】 R⁹がNH₂またはSHであるものを除く請求項4あるいは5に記載のマルトオリゴ糖誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体を含むことを特徴とする共重合体からなるマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項7】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる請求項6に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項8】 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む共重合体からなる請求項6または7に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項9】 架橋剤がN、N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項8に記載のマルトース結合蛋白質リガンド。 ★50

★【請求項10】 R⁹がNH₂またはSHであるものを除く請求項4あるいは5に記載のマルトオリゴ糖誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合体からなる請求項6～9のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項11】 架橋剤の割合が0.1～20%である共重合体からなる請求項8～10のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンド。

【請求項12】 請求項1～3または6～11のいずれかに記載のマルトース結合蛋白質リガンドにマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されていることを特徴とする固定化酵素。

【請求項13】 酵素が糖転移酵素である請求項12に記載の固定化酵素。

【請求項14】 糖転移酵素がβ1,4-ガラクトース転移酵素である請求項13に記載の固定化酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規なマルトオリゴ糖誘導体および該マルトオリゴ糖誘導体の構造を部分構造として有する高分子に関する。また、本発明は該マルトオリゴ糖誘導体構造を部分構造として有する高分子を利用した固定化酵素に関する。

【0002】

【従来の技術】近年遺伝子組換え技術が進歩し、種々の酵素が大腸菌をはじめとする細菌類で生産されるように

なった。しかし、ヒトなどの高等動物由来の酵素を発現させようとしたとき、発現蛋白質が不溶性のインクルージョンボディを形成し、酵素活性を発現できないことがしばしばあり、このようなときの有効な解決手段として、目的とする酵素を他の蛋白質、例えばマルトース結合蛋白質（以下、MBPと示す）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどとの融合蛋白質として発現させるという方法が用いられる。例えば、MBPとの融合蛋白質として発現させる方法は特許第2703770号公報に開示されている。その中で、可溶性蛋白質として発現できる他に、MBPのマルトース結合性を利用して、融合蛋白質を精製できるという利点がある。精製には架橋アミロースを担体とするアフィニティクロマトグラフィーが用いられており、アミロースレジンという商品名でその担体は市販されている。しかし、架橋アミロースとMBPの結合は必ずしも強いものではなく、場合によっては酵素が吸着しなかったり、吸着が弱く溶出前の洗浄の時点で酵素が溶出してしまい十分に精製できないことがある。これは、MBPの基質特異性に起因しており、より親和性の高い担体を用いることにより克服できる。

【0003】また、架橋アミロースに吸着した酵素は固定化酵素としても利用でき、担体との親和性が十分でないときには酵素を結合できなかったり、一旦固定化された酵素が脱離してくる。固定化酵素を調製すると言う点からもより親和性の高い担体が望まれる。

【0004】マルトオリゴ糖鎖を側鎖に有する高分子としては、エピクロロヒドリンを用いてアガロースなどにマルトオリゴ糖を結合させたものがあるが、マルトオリゴ糖鎖の密度をコントロールできないため、オリゴ糖鎖がMBPと酵素の融合蛋白質との結合に必ずしも有効に利用されているとはいえない。この他には、マルトオリゴ糖と分子内にアミノ基と重合性ビニル基を有する化合物とを還元アミノ化により結合させ、重合性ビニル基を重合させることによりマルトオリゴ糖鎖を側鎖にもつ高*

*分子を得る方法がある。しかし、この方法ではオリゴ糖鎖の還元末端にある糖が開環してしまうため、貴重な糖鎖の糖残基が1つ減ってしまうという欠点がある。また、還元アミノ化ではシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような有毒な物質を用いるため危険であるという欠点もある。

【0005】特開2001-40046号では、簡便に調製でき、架橋アミロースより親和性の高い担体としてがマルトオリゴ糖を担持させた高分子が開示されている。しかし、MBPとの親和性はマルトオリゴ糖残基が担っており、マルトオリゴ糖残基部分を化学修飾することにより、まだまだ親和性を向上させる余地がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、MBPとより親和性の高い高分子担体を用い、MBPと酵素との融合蛋白質を容易に、効率よく、分離精製する方法および容易に、効率よく、しかも酵素脱離の起こりにくい固定化方法を提供することにある。

【0007】

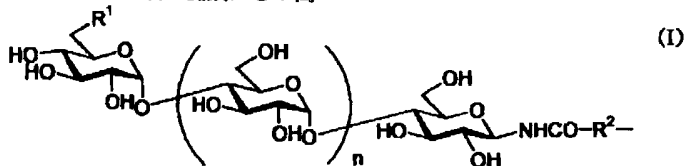
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決するために鋭意検討した結果、新規なマルトオリゴ糖誘導体を合成し、該マルトオリゴ糖誘導体が担持された高分子を得ることにより、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1)一般式(I) (式中、 R^1 はOHまたは NR^3 、 R^4 、 R^2 はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカー、 R^3 および R^4 は独立してHまたは炭素数1~4のアルキル基を示し、nは0~5までの整数を示す)で表される基が結合していることを特徴とするマルトース結合蛋白質リガンド。

【0009】

【化4】



(I)

【0010】(2) R^2 が式(II) (式中、 R^5 は炭素数1~19のアルキレン基、 R^6 はO、SあるいはNHを示し、 R^6 を介して高分子担体と結合している)で表される基である(1)のマルトース結合蛋白質リガンド。

【0011】

【化5】



【0012】(3) 高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、ス※50

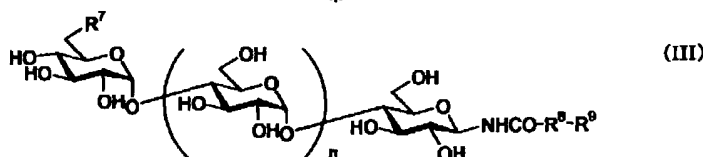
※チレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖である(1)または(2)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(4)一般式(III) (式中、 R^7 はOHまたは NR^{10} 、 R^{11} 、 R^8 はメチレン基1~19個分の長さを有するリンカー、 R^9 は NH_2 、 SH 、 $OCOCH=CH_2$ 、 $OCOCH(CH_3)=CH_2$ 、 $NHCOCH=CH_2$ または $NHCOCH(CH_3)=CH_2$ 、 R^{10} および R^{11} は独立してHまた

は炭素数1~4のアルキル基を示し、nは0~5までの整数を示す)で表されることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体。

*【0013】

【化6】



【0014】(5) R⁸が炭素数1~19のアルキレン基である(4)のマルトオリゴ糖誘導体。

(6) R⁹がNH₂またはSHであるものを除く(4)あるいは(5)のマルトオリゴ糖誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体を含むことを特徴とする共重合体からなるマルトース結合蛋白質リガンド。

(7) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる(6)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(8) 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む共重合体からなる(6)または(7)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(9) 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる(8)のマルトース結合蛋白質リガンド。

(10) R⁹がNH₂またはSHであるものを除く(4)あるいは(5)のマルトオリゴ糖誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:10~10000である共重合体からなる(6)~(9)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンド。

(11) 架橋剤の割合が0.1~20%である共重合体からなる(8)~(10)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンド。

(12) (1)~(3)または(6)~(11)のいずれかのマルトース結合蛋白質リガンドにマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されていることを特徴とする固定化酵素。

(13) 酵素が糖転移酵素である(12)の固定化酵素。

(14) 糖転移酵素がβ1,4-ガラクトース転移酵素である(13)の固定化酵素。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を挙げて詳細に説明する。本発明のマルトース結合蛋白質リガンドは高分子担体上に上記一般式(I)で表される基が結合している。式中、R¹はOHまたはNR³R⁴、R²はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカー、R³およびR⁴は独立してHまたは炭素数1~4のアルキル

10※基を示し、nは0~5までの整数を示す。R²のメチレン基1~20個分の長さを有するリンカーとしては、例えば上記式(II)で表される基(式中、R⁵は炭素数1~19のアルキレン基、R⁶はO、SあるいはNHを示す)が例示され、R⁵の炭素数1~19のアルキレン基としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ヘキシレン基、オクチレン基、ドデシレン基、オクタドデシレン基などが、R³およびR⁴の炭素数1~4のアルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基などが挙げられる。

【0016】本発明のマルトース結合蛋白質リガンドとしては、R¹、R²およびnは任意に組み合わせることができる。

【0017】本発明で用いることのできる高分子担体は、一般式(I)で表される基が結合できるものであれば特に制限はなく、例えばアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類よりなる群から選択されるビニル化合物の重合体または共重合体あるいは多糖などが挙げられる。アクリルアミド類としてはアクリルアミドやN-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドなどのN-アルキルアクリルアミド類などが例示される。メタクリルアミド類としてはメタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミドやN-イソプロピルメタクリルアミドなどのN-アルキルメタクリルアミド類などが例示される。アクリル酸エステル類としてはアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。メタクリル酸エステル類としてはメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。スチレン類としてはスチレン、p-ヒドロキシスチレンなどが例示される。脂肪酸ビニルエステル類としては酢酸ビニル、酪酸ビニルなどが例示される。多糖としてはセルロース、キチン、キトサンや架橋アガロース、架橋デキストランなどの架橋された多糖などが例示される。また、ここに挙げた高分子担体は、一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を結合させるため適当な方法で活性化されたものも含まれる。さらに、本発明中の脂肪酸ビニルエステルの重合体あるいは共重合体には、重合反応後ア

ルカリなどによりエステル結合を全部あるいは一部加水分解したものも含まれる。

【0018】本発明の高分子担体上に一般式(I)で表される基が結合しているマルトース結合蛋白質リガンドは、 R^9 が NH_2 または SH であるものを除く一般式(II I)で表されるマルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体とを共重合あるいは高分子担体上にグラフト共重合させること、あるいは R^9 が NH_2 または SH である一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を上記高分子担体上の適当な官能基と結合させることにより得ることができる。共重合はラジカル重合、カチオン重合、アニオン重合などの手法を用いることにより行うことができ、通常ペルオキソ二硫酸アンモニウムなどを触媒とするラジカル重合により行うことができる。共重合させるとき架橋剤を共存させてもかまわない。利用できる架橋剤としては、分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体であれば特に制限はなく、 N 、 N' -メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンなどが開示される。また、上記マルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体との共重合比は1:5~1000000が好ましく、特に1:10~100000が好ましい。さらに、架橋剤を用いるときは、上記マルトオリゴ糖誘導体と上記ビニル系単量体の合計量に対してその割合が、0.05~30%が好ましく、0.1~20%が特に好ましい。 R^9 が NH_2 または SH である一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を高分子担体に結合させる方法としては特に制限はないが、高分子担体上の官能基を適当な方法で活性化しておくのが好ましい。例えば、高分子担体上の官能基がカルボキシル基の場合は N -ヒドロキシコハク酸イミド基などに、チオール基の場合は2-ピリジルジスルフィド基などに活性化させておくのが好ましい。

【0019】本発明の一般式(III)で表されるマルトオリゴ糖誘導体は、通常用いられている各種有機合成化学的な手法により合成することができる。例えば、 R^7 が OH 、 R^9 が NH_2 または SH の場合、マルトオリゴ糖をアンモニウム塩と反応させてグリコシルアミンとし、カルボジイミドに代表される縮合剤存在下に N -保護- ω -アミノ脂肪酸あるいは S -保護- ω -メルカプト脂肪酸と反応させた後、 N -保護基あるいは S -保護基を脱保護することにより得ることができる。また、 R^7 が NH_2 、 R^9 が SH の場合、上記と同様の方法で S -保護- ω -メルカプト脂肪酸と縮合させるところまで行い、その後非還元末端のグルコース残基の4、6位をベンザルプロミドなどを用いて選択的にベンジリデン化し、さらに残存する OH 基を無水酢酸などを用いてアセチル化する。アセチル化した後、 N -ブロモコハク酸イミドなどにより6位を選択的に開裂し、次いでアジ化ナトリウムで処理することにより6位をアジド化する。接触還元

によりアジド基をアミノ基に還元すると同時に4位のベンゾイル基を脱保護し、さらにナトリウムメチラートなどを用いて脱アセチル化、 S -保護基を脱保護することにより得ることができる。さらに、 R^7 が NH_2 、 R^9 が $NHCOCH=CH_2$ の場合、まずマルトオリゴ糖をベンジルアルコールで1位をベンジル化する。次いでベンザルプロミドなどを用いてマルトオリゴ糖の非還元末端グルコース残基の4、6位を選択的にベンジリデン化した後、同様に残存する OH 基を無水酢酸などによるアセチル化、 N -ブロモコハク酸イミドなどによる6位の選択的開裂、アジ化ナトリウムによる6位のアジド化、ナトリウムメチラートによる脱アセチル化、接触還元によるアジド基のアミノ基への還元と4位ベンゾイル基の脱保護を行う。さらに、アミノ基を適当な保護基で保護することにより、還元末端のグルコース残基の6位 OH 基が保護されたアミノ基で置換されたマルトオリゴ糖が得られる。得られたマルトオリゴ糖を上記と同様の方法でグリコシルアミンとし、 N -保護- ω -アミノ脂肪酸と縮合させた後、 ω -アミノ基の保護基を脱保護する。さらに、塩化アクリロイルなどによりアクリロイル化した後、残るアミノ基の保護基を脱保護することにより目的のマルトオリゴ糖誘導体を得ることができる。 N -保護- ω -アミノ脂肪酸の保護基と非還元末端グルコース残基の6位アミノ基の保護基はそれぞれ異なる条件で脱保護される必要があり、その組み合わせとしては、例えば N -保護- ω -アミノ脂肪酸の保護基としてベンジルオキシカルボニル基、非還元末端グルコース残基の6位アミノ基の保護基として t -ブトキシカルボニル基の組み合わせなどが挙げられる。

【0020】本発明の固定化酵素に用いることのできるマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質は、マルトース結合性を有しているマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質であれば、特に制限はなく、一般的には遺伝子組換え手法を利用して得ることができる。また、酵素は目的とする酵素活性を有していれば必ずしも酵素蛋白質全体である必要はなく、その断片であっても構わない。利用できる酵素としては特に制限はないが、糖転移酵素が好ましい。糖転移酵素としては、ガラクトース転移酵素、 N -アセチルグルコサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素、 N -アセチルガラクトサミン転移酵素、キシロース転移酵素、グルクロン酸転移酵素などが挙げられる。

【0021】本発明の固定化酵素は、上記マルトオリゴ糖誘導体が結合した高分子担体あるいは上記マルトオリゴ糖誘導体とビニル系単量体との共重合体と上記融合蛋白質とを適当な溶液中で接触させることにより調製することができる。用いることのできる溶液としては、融合蛋白質の酵素活性が失活しないものであれば特に制限はないが、通常 pH 7付近の緩衝液が用いられる。必要に応じて、融合蛋白質を安定化させるような添加剤、例え

ば、2-メルカプトエタノールなどのような還元剤やカルシウム、マグネシウム、マンガンなどの金属塩を添加しても構わない。共重合体あるいはグラフト共重合体と融合蛋白質とは上記緩衝液中で、通常0~40℃で5分~24時間接触させる。このとき穏やかに振とうさせてもよい。

【0022】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例により限定されるものではない。

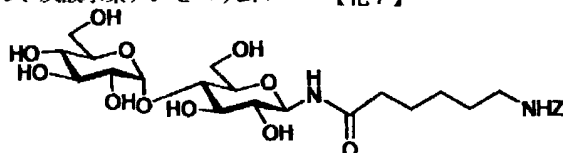
【0023】参考例1 [6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミンの合成

マルトース5gと炭酸水素アンモニウム39.8gを蒸留水50mlに溶かし、室温で5日間攪拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウム*

*の匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣と6-N-(ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノ酸4gを乾燥ジメチルホルムアミド100mlに溶かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド4.0gと1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物3.2gを加え、室温で24時間攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー(溶出液 95%エタノール)を用いて精製し、目的物3.5gを得た。[6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミンは下記構造式(式中、Zはベンジルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0024】

【化7】



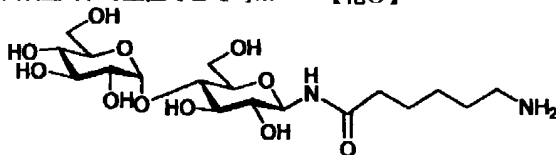
【0025】実施例1 6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン

参考例1で得た[6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル]-β-マルトシルアミン100mgをメタノール30mlに溶かし、10%パラジウム炭素30mgを加え、水素雰囲気下で室温で24時※

※間攪拌した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物72mgを得た。6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミンは下記構造式を有する。

【0026】

【化8】



【0027】参考例2 ベンジルマルトシドの合成

マルトース17.1gとベンジルアルコール54gをとり、これにH⁺型にした陽イオン交換樹脂Dowex 50WX-8(ダウケミカル製)3gを加え、5時間還流した。反応後、Sephadex LH-20(アマシヤムファルマシア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 95%エタノール)を用いて精製し、目的物4.3gを得た。

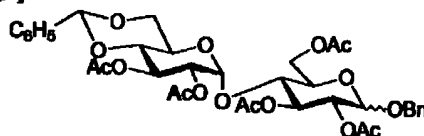
【0028】参考例3 ベンジル2,3,6,2',3'-ペンター-O-アセチル-4',6'-O-ベンジリデン-マルトシドの合成

参考例2で得たベンジルマルトシド4.3gをピリジン50mlに溶かし、ベンザルプロミド2.75gを加えて65℃にて1時間攪拌した。その反応溶液を室温に戻した後に無水酢酸120mlを加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、飽和炭★50

★炭水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、セライトろ過で硫酸ナトリウムを除いた後、ろ液を減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 トルエン:酢酸エチル=2:1)で精製し、目的物2.5gを得た。ベンジル2,3,6,2',3'-ペンター-O-アセチル-4',6'-O-ベンジリデン-マルトシドは下記構造式(式中、Acはアセチル基、Bnはベンジル基を示す)を有する。

【0029】

【化9】

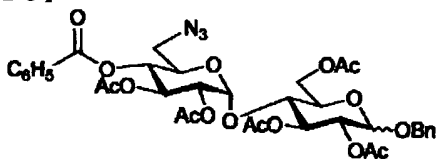


11

【0030】参考例4 ベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシマルトシドの合成
参考例3で得たベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-4', 6'-O-ベンジリデンマルトシド1.5gを乾燥ジクロロエタン50mlと四塩化炭素100mlからなる混合溶媒に溶かし、N-ブロモコハク酸イミド1.1gと炭酸バリウム230mgを加えて、65℃で3時間攪拌した。その後、反応溶液にジメチルホルムアミド100mlとアジ化ナトリウム2gを加え、120℃にて24時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、水で洗浄し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液 トルエン：酢酸エチル=2：1）にて精製し、目的物400mgを得た。ベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシマルトシドは下記構造式（式中、Acはアセチル基、Bnはベンジル基を示す）を有する。

【0031】

【化10】

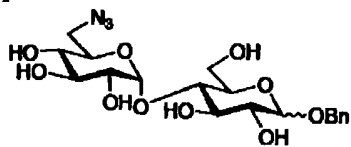


【0032】参考例5 ベンジル6'-アジド-6'-デオキシマルトシドの合成

参考例4で得たベンジル2, 3, 6, 2', 3'-ペンター-O-アセチル-6'-アジド-4'-O-ベンゾイル-6'-デオキシマルトシド310mgを乾燥メタノール50mlに溶かし、1.66Mナトリウムメチラートメタノール溶液2.9mlを加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液をH⁺型にした陽イオン交換樹脂Dowex 50WX-8（ダウケミカル製）を用いて、pH7に中和した後、樹脂をろ別した。ろ液を減圧濃縮して、目的物174mgを得た。ベンジル6'-アジド-6'-デオキシマルトシドは下記構造式（式中、Bnはベンジル基を示す）を有する。

【0033】

【化11】



【0034】参考例6 6'-アミノ-6'-デオキシマルトース

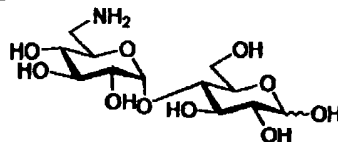
参考例5で得た。ベンジル6'-アジド-6'-デオキシ

12

シーマルトシド137mgをメタノール30mlに溶かし、10%パラジウム炭素30mgを加え、水素雰囲気下で24時間攪拌した。反応液をセライトろ過した後、ろ液を減圧濃縮し、目的物97mgを得た。6'-アミノ-6'-デオキシマルトースは下記構造式を有する。

【0035】

【化12】

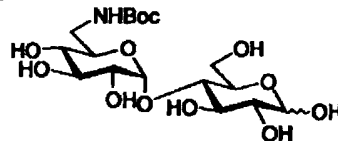


【0036】参考例7 6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシマルトースの合成

参考例6で得た6'-アミノ-6'-デオキシマルトース68mgをジオキサン-水（2：1）10mlに溶かし、1N水酸化ナトリウム水溶液0.2mlとジ-t-ブチルジカルボネート48mgを加えた。室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。Sephadex G-10（アマシャムファルマシア製）カラムクロマトグラフィー（溶出液 蒸留水）を用いて精製し、目的物79mgを得た。6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシマルトースは下記構造式（式中、Bocはt-ブトキシカルボニル基を示す）を有する。

【0037】

【化13】



【0038】参考例8 6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-beta-マルトシルアミンの合成

参考例7で得た6'-t-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシマルトース66mgと炭酸水素ナトリウム0.4gを蒸留水5mlに溶かし、室温で5日間攪拌した。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その残渣と6-N-(ベンジロキシカルボニル)-アミノヘキサノ酸44mgを乾燥ジメチルホルムアミド5mlに溶かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド45mgと1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物36mgを加え、室温で24時間攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー（溶出液 95%エタノール）を用

13

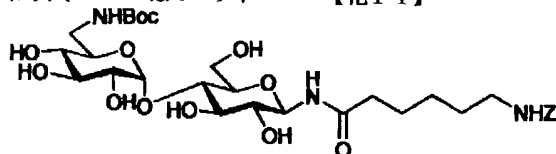
14

いて精製し、目的物44mgを得た。6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンは下記構造式(式中、Bocはtert-ブト*

*キシカルボニル基、Zはベンジルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0039】

【化14】



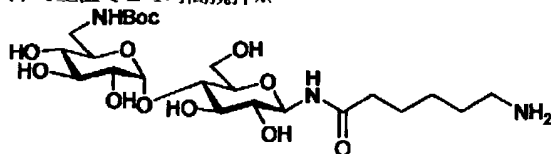
【0040】参考例9 6-アミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンの合成

参考例8で得た6-(N'-ベンジルオキシカルボニル)-アミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミン35mgをメタノール5mlに溶かし、10%パラジウム炭素15mgを加え、水素雰囲気下で室温で24時間攪拌※

した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物27mgを得た。6-アミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンは下記構造式(式中、Bocはtert-ブトキシカルボニル基を示す)を有する。

【0041】

【化15】



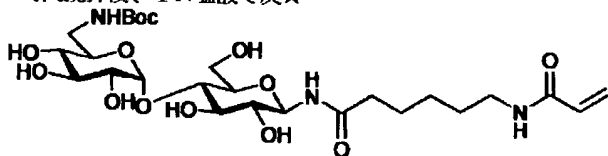
【0042】参考例10 6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンの合成

参考例9で得た6-アミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミン27mgを蒸留水5mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液を0.06ml加えた。さらに、塩化アクリロイル6mgを含むテトラヒドロフラン0.5mlを氷冷下撹拌しながら滴下した。このとき、pH8.5を保つように適宜0.2N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpHを調整した。約2時間撹拌後、1N塩酸で反★

★応液を中和し、凍結乾燥した。残渣を70%エタノールで溶解し、Sephadex LH-20(アマシャムファルマシア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液70%エタノール)を用いて精製し、目的物12mgを得た。6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンは下記構造式(式中、Bocはtert-ブトキシカルボニル基を示す)を有する。

【0043】

【化16】



【0044】実施例2 6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンの合成

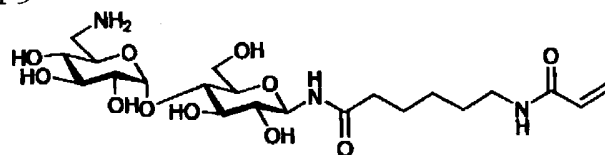
参考例10で得た6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-tert-ブトキシカルボニルアミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミン12mgをとり、これに30%トリフロロ酢酸水溶液5mlを加え、室温で30分間撹拌☆

☆拌した。反応後、反応液にジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させた。沈殿をジエチルエーテルで数回洗浄した後、これを乾燥させ、目的物9mgを得た。6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンは下記構造式を有する。

【0045】

【化17】

15



16

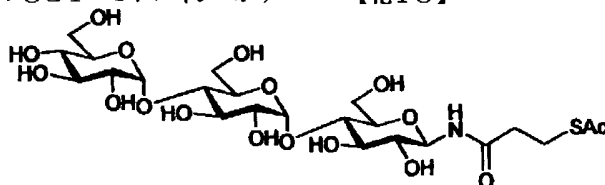
【0046】参考例11 3-S-アセチルチオプロピ
オイルβ-マルトトリオシルアミンの合成

マルトトリオース15、5gと炭酸水素アンモニウム9
4gを蒸留水100mlに溶かし、室温で5日間攪拌し
た。反応後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アン
モニウムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返
した。その残渣と3-S-アセチルメルカプトプロピオン
酸5、3gを乾燥ジメチルホルムアミド100mlに溶
かし、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロ
ピル)カルボジイミド5、7gと1-ヒドロキシベンゾ*

*トリアゾール-水和物4、6gを加え、室温で24時間
攪拌した。反応後、反応溶液をクロロホルムで洗浄
し、水で抽出を行ない、減圧下で濃縮した。この残渣を
Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィー（溶出液 95%エタノール）を用いて精製し、目的
物8、4gを得た。3-S-アセチルチオプロピオイル
β-マルトトリオシルアミンは下記構造式（式中、Ac
はアセチル基を示す）を有する。

【0047】

【化18】



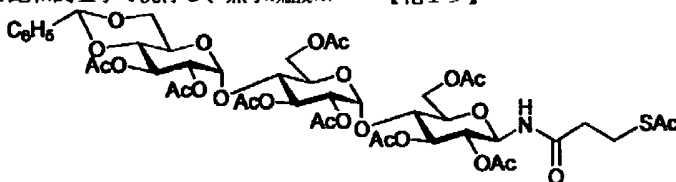
【0048】参考例12 3-S-アセチルチオプロピ
オイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オ
クター-O-アセチル-4'', 6''-O-ベンジリデン-
β-マルトトリオシルアミンの合成

参考例11で得た3-S-アセチルチオプロピオイルβ-
マルトトリオシルアミン6、4gをピリジン100m
lに溶かし、ベンザルプロミド2、8gを加えて65℃
にて1時間攪拌した。その反応溶液を室温に戻した後に
無水酢酸150mlを加え、室温で24時間攪拌した。30
反応溶液をクロロホルムで抽出した後、飽和炭酸水素ナ
トリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸※

※ナトリウムを用いて乾燥させ、セライトろ過で硫酸ナト
リウムを除いた後、ろ液を減圧下で濃縮した。その残渣
をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液 トルエン：
酢酸エチル=2：1）で精製し、目的物2、2gを得
た。3-S-アセチルチオプロピオイル2, 3, 6,
2', 3', 6', 2'', 3''-オクター-O-アセチル-
4'', 6''-O-ベンジリデン-β-マルトトリオシ
ルアミンは下記構造式（式中、Acはアセチル基を示
す）を有する。

【0049】

【化19】



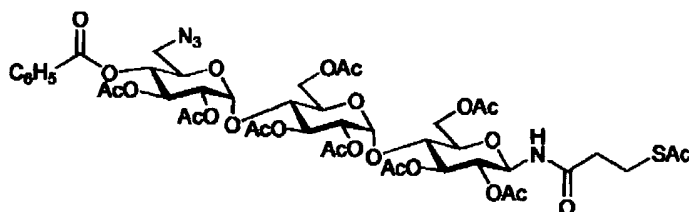
【0050】参考例13 3-S-アセチルチオプロピ
オイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オ
クター-O-アセチル-6''-アジド-4''-O-ベンゾ
イル-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンの
合成

参考例12で得た3-S-アセチルチオプロピオイル
2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクター
-O-アセチル-4'', 6''-O-ベンジリデン-β-マ
ルトトリオシルアミン2、1gを乾燥ジクロロエタン5
0mlと四塩化炭素100mlからなる混合溶媒に溶か
し、N-プロモコハク酸イミド1、1gと炭酸バリウ
ム230mgを加えて、65℃で3時間攪拌した。その★50

★後、反応溶液にジメチルホルムアミド100mlとアジ
化ナトリウム2gを加え、120℃にて24時間攪拌し
た。反応溶液をクロロホルムで抽出した後、水で洗浄
し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルクロマ
トグラフィー（溶出液 トルエン：酢酸エチル=2：1）
にて精製し、目的物589mgを得た。3-S-アセチ
ルチオプロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6',
2'', 3''-オクター-O-アセチル-6''-アジド-
4''-O-ベンゾイル-6''-デオキシ-β-マルト
トリオシルアミンは下記構造式（式中、Acはアセチル基
を示す）を有する。

【0051】

【化20】

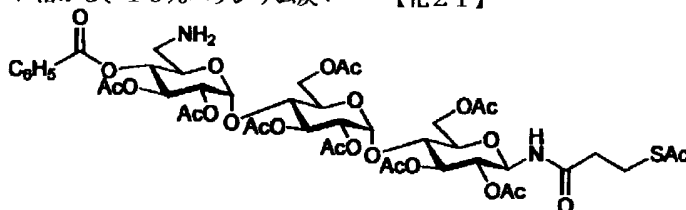


【0052】参考例14 3-S-アセチルチオアロピ
オイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オ
クター-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル
-6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンの合成
参考例13で得た3-S-アセチルチオアロピオイル
2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクター
-O-アセチル-6''-アジド-4''-O-ベンゾイル-
6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン550m
gをメタノール50mlに溶かし、10%パラジウム炭*

* 素30mgを加え、水素雰囲気下で24時間撹拌した。
反応液をセライトろ過した後、ろ液を減圧濃縮し、目的
物510mgを得た。3-S-アセチルチオアロピオイル2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オク
-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル-
6''-デオキシ-β-マルトトリオシルアミンは下記構
造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0053】

【化21】



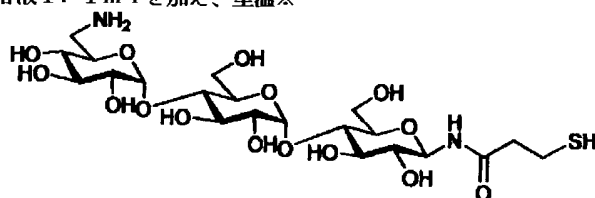
【0054】実施例3 3-メルカプトアロピオイル
6''-アミノ-6''-デオキシ-β-マルトトリオシル
アミンの合成

参考例14で得た3-S-アセチルチオアロピオイル
2, 3, 6, 2', 3', 6', 2'', 3''-オクター
-O-アセチル-6''-アミノ-4''-ベンゾイル-6''
-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン107mgを
乾燥メタノール20mlに溶かし、1.66Mナトリウ
ムメチラート-メタノール溶液1.1mlを加え、室温※

※で24時間撹拌した。反応溶液をH⁺型にした陽イオン
交換樹脂Dowex 50WX-8 (ダウケミカル製)を
用いて、pH7に中和した後、樹脂をろ別した。ろ液を
減圧濃縮して、目的物55mgを得た。3-メルカプト
アロピオイル6''-アミノ-6''-デオキシ-β-マル
トトリオシルアミンは下記構造式を有する。

【0055】

【化22】



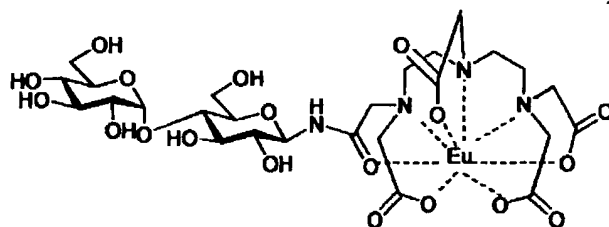
【0056】参考例15 N, N', N'', N''-テ
トラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β
-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体の合成

マルトース50mgと炭酸水素アンモニウム10gを蒸
留水50mlに溶かし、室温で5日間撹拌した。反応
後、反応溶液を減圧下で濃縮し、炭酸水素アンモニウ
ムの匂いが消えるまでトルエンで共沸を繰り返した。その
残渣に無水ジエチレントリアミン-N, N', N'',
N''-五酢酸149mgを加え、10%炭酸水素
ナトリウム水溶液3mlに溶かし、室温で2時間撹拌し
た。Sephadex G-10 (アマシャムファルマ
シア製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 蒸留水)★

★を用いて精製した。生成物画分を凍結乾燥し、得られた
固形物10mgを蒸留水2mlに溶解し、酢酸ユウロピ
ウム9mgを加え、室温で1時間撹拌した。反応液をS
ephadex G-10 (アマシャムファルマシア
製)カラムクロマトグラフィー(溶出液 蒸留水)を2
回行い、精製し、目的物45mgを得た。N, N',
N'', N''-テトラカルボキシメチルジエチレントリア
ミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯
体は下記構造式を有する。

【0057】

【化23】



【0058】実施例4 DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro-immunoassay) による各種

マルトオリゴ糖誘導体とマルトース結合蛋白質との親和性の評価
96穴マイクロプレートに200nMマルトース結合蛋白質の25mMリン酸緩衝液 (pH7.4, 0.9%NaCl含有、以下PBSと略する) 溶液0.1mlを加えて、4℃で24時間インキュベートを行ない、マルトース結合蛋白質溶液を取り除いた後に3度、PBS (0.05%Tween20含有) 0.2mlで洗浄し、プレート上にマルトース結合蛋白質をコーティングした。次に、様々な濃度のマルトオリゴ糖誘導体と参考例15で得たN, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体を3μM含む混合溶液を調製し、マルトース結合蛋白質をコーティングしたプレート穴に50μlづつ加え、室温で30分間静置した。その後、混合溶液を取り除き、8度PBS (0.05%Tween20含有) 0.2mlで洗浄した後に、エンハン*

* スメント溶液 (50μM酸化トリオクチルホンフィン、15μM4, 4, 4-トリフクロ-1-(2-ナフチル)-1, 3-ブタンジオン、0.1%トリトンX-100を含む0.1M酢酸-フタル酸水素カリウム緩衝液 (pH3.2)) 0.15mlを加え、15分間振動させた。そして、遊離したユウロピウムイオン濃度を蛍光光度計で測定 (励起波長340nm、蛍光波長615nm) した。マルトオリゴ糖誘導体濃度に対して遊離したユウロピウムイオン濃度をプロットし、マルトース結合蛋白質とN, N', N'', N'''-テトラカルボキシメチルジエチレントリアミノアセチル-β-マルトシルアミン-ユウロピウム錯体との結合に対する阻害定数を求めた。マルトオリゴ糖誘導体としては、マルトース、マルトトリオース、実施例1~3で得たマルトオリゴ糖誘導体を用いた。各々対応するマルトオリゴ糖に比べ、マルトオリゴ糖誘導体の方がマルトース結合蛋白質に対する親和性が向上していた。

【0059】

【表1】

| | 阻害定数 (IC ₅₀) |
|----------|--------------------------|
| マルトース | 700 μM |
| マルトトリオース | 1.2 μM |
| 実施例1 | 3 μM |
| 実施例2 | 1.2 μM |
| 実施例3 | 0.3 μM |

【0060】実施例5 6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン結合セファロースの調製

実施例1で得た6-アミノヘキサノイル-β-マルトシルアミン23mgを50mMHEPES緩衝液 (pH7.0) 5mlに溶かし、予め1mM塩酸で洗浄したNHS活性化Sepharose 4FF (アマシャムファルマシア製) 2mlを加え、室温で4時間穏やかに振とうした。樹脂をろ別し、これに50mMTris-HCl緩衝液 (pH8.0) を5ml加え、室温で4時間穏やかに振とうすることにより樹脂上に残存する活性部位をブロックした。50mM酢酸緩衝液 (pH4.0)、50mMTris-HCl緩衝液 (pH8.0) で交互に3回ずつ洗浄し、20mMTris-HCl緩衝液 (pH8.0) の中で冷蔵保存した。

※【0061】実施例6 6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミンとアクリルアミドとの共重合体 (1:1000) の調製

実施例2で得た6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'-デオキシ-β-マルトシルアミン5mgおよびアクリルアミド710mgを蒸留水25mlに溶解し、ここにN, N'-メチレンビスアクリルアミド57mg、N, N', N'', N'''-テトラメチルエチレンジアミン10μlを加え、溶解した。溶液を4℃に冷やし、ここに10%ペルオキソ二硫酸アンモニウム水溶液125μlを添加し、1時間重合させた。重合後、得られたゲルを凍結乾燥し、共重合体750mgを得た。共重合体はホモジイズした後、20mMTris

21

-HC1緩衝液(pH8.0)の中で冷蔵保存した。

【0062】実施例7 3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン結合セファロースの調製

実施例3で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"-デオキシ-β-マルトトリオシルアミン29mgを50mMHEPES緩衝液(pH7.0)5mlに溶かし、活性化Thiol Sepharose 4FF(アマシャムファルマシア製)2mlを加え、室温で12時間穏やかに振とうした。樹脂をろ別し、0.1%牛血清アルブミンを含む25mMHEPES緩衝液(pH7.4)で十分洗浄した後、20mMTris-HC1緩衝液(pH8.0)の中で冷蔵保存した。

【0063】参考例15 β1, 4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

適当な濃度の酵素液40μlを19mMD-グルコース、0.37mMUDP-ガラクトース、0.14mMβ-NADH、1.3mMホスホエノールピルビン酸、17.5Uピルビン酸キナーゼ、25U乳酸脱水素酵素、5.0mM塩化マンガン水溶液、0.02%α-ラクトアルブミンを含む52mMグリシルグリシン緩衝液(pH8.4)3.025mlに加え、30℃で約10min反応させ、340nmにおける吸光度(以下、A340と示す)の減少を記録した。ブランクとして酵素液の代わりに20mMTris-HC1緩衝液(pH7.5、2mMエチレンジアミン四酢酸・4Na、2mM2-メルカプトエタノールを含む)を用いた。テストおよびブランクの最大ΔA340/分を求め、以下の算出式に従い活性を算出した。

$$U/ml = (\Delta A340/分(テスト) - \Delta A340/分(ブランク)) \times 3.065 \div 6.022 \div 0.04$$

【0064】なお、α-ラクトアルブミン存在下、30℃、pH8.4で1分間にUDP-ガラクトースよりD-グルコースへガラクトース1μmol転移させる酵素量を1Uと定義した。

【0065】参考例16 MBP-β1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の調製

ヒト胎盤より取得したβ1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子より膜結合部位をコードする部分を取り除いた遺伝子をベクターpMAL-p2(NEB社製)のEcoRIおよびSalIサイトに挿入し、MBP-β1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質発現ベクターpMG-P21を調製した。該発現ベクターpMG-P21でエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)JM109を形質転換し、MBP-β1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質生産菌エシェリヒア・コリJM109(pMG-P21)を得た。本菌を0.2%グルコースおよびアンピシリン50mg/Lを含むLB培地50mlの入った500ml容坂口フラスコに接種し、37℃、16時間、180rpmで振とう培養した。得られた培養液

22

を上記培地3Lの入った5L容ジャーファメンターに30ml接種し、25℃、通気量1.5L/分、6時間、300rpmで攪拌し培養した。その後、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシドを0.3mMになるように添加し、さらに18時間培養を続けた。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。集めた菌体を0.1MNaCl、1mMエチレンジアミン四酢酸・2Na、10mM2-メルカプトエタノールを含む20mMTris-HC1(pH7.4;以下、カラムバッファ- (pH7.4、0.1MNaCl)と示す)150mlで懸濁し、超音波破砕機により、菌体を破砕し、融合蛋白質を抽出した。

【0066】破砕液を遠心分離し、無細胞抽出液155mlを得た。無細胞抽出液のβ1, 4-ガラクトース転移酵素活性は1.4U/mlであり、比活性は80mU/mg-蛋白質であった。得られた無細胞抽出液にポリエチレンジアミンを0.7%になるまで攪拌しながら徐々に加えた。このときpHが8を越えないようにHC1でpHを調節した。添加後、さらに30分間攪拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離で取り除き、上清160mlを得た。ここに、硫酸アンモニウムを75.5g(70%飽和)4℃で攪拌しながら徐々に加えた。添加後、さらに1時間攪拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離にて集めた。得られた沈殿をカラムバッファ- (pH8.0)で再溶解し、30mlにした。これを透析(外液はカラムバッファ- (pH8.0))により、脱塩した。予めカラムバッファ- (pH8.0)で平衡化したDEAE-Sepharose CL6B(アマシャムファルマシア製)を50ml充填したカラムに、脱塩した酵素液を吸着させ、同バッファ- 150mlで洗浄後、同バッファ- 250mlおよびカラムバッファ- (pH8.0、0.1MNaCl)250mlを用いたリニアグラジェントにより溶出させることにより、MBP-β1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質画18mlとして精製した。得られた精製酵素液は活性6.2U/ml、比活性3.2U/mg-蛋白質であった。

【0067】参考例17 固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を適量とり、100nM PA化オリゴ糖(GlcNAcβ1→2Manα1→3(GlcNAcβ1→2Manα1→6)Manβ1→4GlcNAcβ1→4GlcNAc-P A)、200μMUDP-Gal、10mM塩化マンガン、α-ラクトアルブミン0.26mg/mlを含む25mMHEPES緩衝液(pH7.5)100μl中、20℃で1時間振とう攪拌しながら反応させた。反応後、生成物量をHPLCにより定量した。参考例15の活性測定法で予め活性を測定した酵素液を用いて、上記活性測定反応を行い、生成物量からガラクトース転移量を求め、検量線を作成し、その検量線より活性を算出し

た。

【0068】実施例8 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その1)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロース50 μ lをとり、これに参考例16で得た精製酵素液50 μ lおよびカラムバッファー(pH8.0)200 μ lを加え、4℃で穏やかに2時間振とうした。遠心分離により上清を取り除き、カラムバッファー(pH8.0)200 μ lで2回洗浄することにより、固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を得た。洗浄液を上清とあわせて回収液とした。回収液および固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の酵素活性を測定し、活性回収率を算出した。固定化酵素の活性は420mU/ml樹脂であり、活性回収率は22%であった。

【0069】実施例9 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その2)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロースの代わりに実施例6で得た6-アクリロイルアミノヘキサノイル6'-アミノ-6'- β -デオキシ- β -マルトシルアミンとアクリルアミドとの共重合体を用いる以外は実施例8と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は330mU/ml樹脂であり、活性回収率は23%であった。

【0070】実施例10 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その3)

実施例5で得た6-アミノヘキサノイル- β -マルトシルアミン結合セファロースの代わりに実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"- β -デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースを用いる以外は実施例8と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は470mU/ml樹脂であり、活性回収率は21%であった。

【0071】実施例11 β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化(その4)

参考例16で得た精製酵素液50 μ lおよびカラムバッファー(pH8.0)200 μ lの代わりに参考例16で得た無細胞抽出液250 μ lを用いる以外は実施例10と同様にして固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は400mU/

ml樹脂であり、活性回収率は20%であった。

【0072】比較例1 アミロースレジン(NEB社製)への β 1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化
実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"- β -デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースの代わりにアミロースレジンを用いる以外は実施例9と同様にして、固定化 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。しかし、固定化酵素としての活性は認められなかった。活性は全て回収液として回収されており、アミロースレジンには酵素は結合していなかった。

【0073】実施例12 3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"- β -デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースを用いたMBP- β 1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の精製
実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"- β -デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロース1mlをカラムに充填し、参考例16で得た無細胞抽出液0.5mlを通液し、融合蛋白質を吸着させた。吸着後カラムバッファー(pH7.4, 0.1MNaCl)5mlでカラムを洗浄した。洗浄後、10mMマルトースを含むカラムバッファー(pH7.4, 0.1MNaCl)3mlで融合蛋白質を溶出させ、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性画分を集めた。得られた酵素液の比活性は1.1U/mg蛋白質であり、約13倍向上していた。

【0074】比較例2 アミロースレジン(NEB社製)を用いたMBP- β 1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の精製

実施例7で得た3-メルカプトプロピオイル6"-アミノ-6"- β -デオキシ- β -マルトトリオシルアミン結合セファロースの代わりにアミロースレジン(NEB社製)を用いて、実施例12と同様にして融合蛋白質を吸着させようとしたが、融合蛋白質は吸着せず、洗浄液中に活性が回収され、精製できなかった。

【0075】

【発明の効果】上述したように、本発明の高分子担体上にマルトオリゴ糖誘導体を結合させたマルトース結合蛋白質リガンドを利用することにより、マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現させた酵素を効率よく、しかも容易に精製したり、固定化することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 西村 紳一郎

北海道札幌市中央区北9条西16丁目1番1号320

(72)発明者 黒河内 政樹

北海道札幌市北区北20条西5丁目20番地エールムハ イツ中島401号

(72)発明者 山田 久里子
北海道札幌市北区麻生町7丁目1番1号
311
(72)発明者 ユアン チュアン リー
アメリカ合衆国メリーランド州21093、チ
モニウム、サヴォコート 1824

Fターム(参考) 4B033 NA25 NA45 NB04 NB13 NB34
NB36 NB44 NC04 NC13 ND03
ND20
4C057 BB03 BB04 CC03 CC04 DD03
HH02
4H045 AA10 BA41 BA60 BA62 DA89
EA60 EA65 FA74 FA82 GA26
4J100 AB02P AB07P AG02P AG04P
AJ02P AL03P AL08P AM15P
BA02H BA03H BA03P BA28H
BA33P BA34H BA51H BC53H
CA01 CA04 CA31 HA19 HA33
HA55 HA61 JA50